Ph.D. disszertáció

A PRIMER KINON ENERGETIKAI VÁLTOZÁSAI A FOTOSZINTETIZÁLÓ BAKTÉRIUMOK REAKCIÓCENTRUMÁBAN:

MUTÁCIÓ, KÉSLELTETETT FLUORESZCENCIA ÉS MODELL-SZÁMÍTÁSOK

Rinyu László

Témavezető: Dr. Maróti Péter, egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem, Biofizikai Tanszék

Szeged, 2007

Tartalomjegyzék

Leggyakrabban használt rövidítések jegyzéke **3**

1. Bevezetés **5**

2. Irodalmi áttekintés **7**
2.1. Fotoszintetizáló bíborbaktériumok . . . 7
2.1.1. Bakteriális reakciócentrum . . . 9
2.1.2. Elektrontranszfer a bakteriális reakciócentrumban . . . 11
2.1.3. Kinonok energetikája, fotociklus . . . 14
2.1.4. Veszteségi folyamatok . . . 16
2.2. Késleltetett fluoreszcencia . . . 17

3. Célkitűzés **20**

4. Anyagok és módszerek **21**
4.1. Baktériumok tenyésztése . . . 21
4.1.1. CYCA1 törzs . . . 21
4.1.2. R26 törzs . . . 22
4.2. Kromatofora izolálása . . . 22
4.3. A reakciócentrum izolálása és tisztítása . . . 22
4.4. Fényindukált abszorpcióváltozás kinetikai mérése . . . 24
4.5. Az abszorpcióváltozások kiértékelése . . . 25
4.6. A késleltetett fluoreszcencia keletkezése . . . 25
4.6.1. Szabad pigment fluoreszcenciája . . . 25
4.6.2. Fotokémiai folyamathoz kötött pigment fluoreszcenciája . . . 26
4.6.3. A fluoreszcencia lecsengésének sebességi állandói . . . 27
4.6.4. A prompt és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdó-viszonyai . . . 28
4.6.5. A prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitás-viszonyai . . . 29
4.7. A prompt és a késleltetett fluoreszcencia mérése . . . 29
4.8. A P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbség kísérleti meghatározása . . . 31
4.9. Alkalmazott számítógép-szimulációs módszerek . . . 31
4.9.1. Molekuladinamika . . . 31
4.9.2. Lineáris kölcsönhatási energiák módszere . . . 34
4.9.3. Szabadenergia perturbáció módszere . . . 34
4.9.4. Automatikus dokkolás . . . 36

5. Eredmények és megvitatásuk **37**
5.1. Fehérjekörnyezet hatása a kinon akceptor-rendszer energetikájára izolált reakciócentrumban . . . 37
5.1.1. Ile^{M265} helyettesítések hatása a Q_A termodinamikai tulajdonságaira 40
5.1.2. Met^{M218} helyettesítések hatása a Q_A termodinamikai tulajdonságaira 45
5.2. Lipidkörnyezet hatása a kinonok viselkedésére izolált reakciócentrumban . . 49
5.3. Reakciócentrum természetes membránban: Kromatofora késleltetett fluoreszcenciája . . . 51
5.3.1. Izolált és membrán-fragmentumba ágyazott reakciócentrum késleltetett fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása . . . 51
5.3.2. Detergens-hatás vizsgálata . . . 52
5.3.3. A kromatofora késleltetett fluoreszcenciájának pH-függése . . . 54
5.3.4. Inhibítor hatása a membrán-fragmentumba ágyazott reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciájára . . . 55
5.3.5. Külső elektrondonor hatása a kromatofora késleltetett fluoreszcenciájára . . . 56
5.3.6. Külső redoxpotenciál hatása . . . 58
5.3.7. Hőmérsékletfüggés . . . 59
5.3.8. A kísérleti eredmények elemzése . . . 60
5.4. Az elsődleges kinon redoxpotenciáljának meghatározása számítógépes szimuláció segítségével vadtípusú és mutáns reakciócentrumokban . . . 63
5.4.1. Kötési szabadenergiák meghatározása LIE módszerrel . . . 66
5.4.2. Kötési szabadenergiák meghatározása automatizált dokkolással . . . 69
5.4.3. FEP szimuláció a kinon redoxállapot-változásának modellezésére reakciócentrum-fehérjében . . . 74

6. Összefoglalás **80**

7. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények **85**

8. Summary **87**
8.1. Introduction . . . 87
8.2. Aims . . . 89
8.3. Materials and methods . . . 89
8.3.1. Measurement of flash-induced absorption change . . . 90
8.3.2. Measurement of delayed and prompt fluorescence . . . 91
8.3.3. Calculation of free energy drop from P^* to $P^+Q_A^-$ . . . 91
8.3.4. Computer simulations . . . 91
8.4. New results . . . 92

Irodalomjegyzék **97**

Köszönetnyilvánítás **110**

Leggyakrabban használt rövidítések jegyzéke

Bkl	- bakterioklorofill
Bfeo	- bakteriofeofitin
ΔG	- szabadenergia-különbség
E_m	- középponti redoxpotenciál
EDTA	- etiléndiamin-tetraecetsav
FEP	- Free Energy Pertubation method - szabadenergia perturbáció módszere
L, M, H	- a bakteriális reakciócentrum fehérje alegységei
LDAO	- laurildimetilamin-N-oxid, ikerionikus detergens
LIE	- Linear Interaction Energy method - lineáris kölcsönhatási energiák módszere
LH I	- egyes fénybegyűjtő antenna-rendszer
LH II	- kettes fénybegyűjtő antenna-rendszer
MD	- molekuladinamika
MM	- molekulamechanika
P, P*, P$^+$	- bakterioklorofill dimer (elsődleges donor)
Q$_A$, Q$_B$	- elsődleges és másodlagos kinon
RC	- fotoszintetikus reakciócentrum

Tris	- 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol
Triton X-100	- oktilfenol-polietilénglikol-éter, neutrális detergens
UQ_{10}	- ubikinon-10, 2,3-dimetoxi-5-metil-6-[10-izoprenoid]-1,4-benzokinon

1. fejezet

Bevezetés

A fotoszintézis az alapvető anyagcsere-folyamatok egyike. A fotoszintetizáló organizmusok (baktériumok, algák, magasabb rendű zöld növények) fényenergiát alakítanak át a szabadenergia egyéb (redoxpotenciál, ion- és proton elektrokémiai potenciál, valamint foszfátpotenciál) formáivá, amelyek közvetlenül alkalmasak a sejt életfolyamataihoz szükséges energia fedezésére, valamint raktározására. Ezek a szervezetek nem csupán magukat látják el energiával, hanem az őket fogyasztó organizmusokat is. Ezzel további élőlények számára is táplálékforrásul szolgálnak, egészen a tápláléklánc végét jelentő csúcsragadozókig. A fotoszintetikus folyamatok alapvetően két fő csoportra oszthatók: fényreakciókra és sötétreakciókra. A fényreakciókban a sötétreakciók energiaforrásai képződnek (ATP [Adenozin Tri-Foszfát] és redukált koenzimek), amelyek lehetővé teszik, hogy a különböző biokémiai anyagcsere-folyamatok (sötétreakciók) láncolatán keresztül nagy energiaértékű szénhidrátok keletkezzenek. A fényreakciók a foton abszorpcióját követően fehérjébe ágyazott, speciálisan orientált pigmentek közreműködésével mennek végbe. A zöld növényekben, ahol a fotoszintézis az eddig ismert legnagyobb hatékonysággal valósul meg, a fényreakciók során NADPH (redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) és ATP termelődik. Ezen folyamatban két egymástól jól elkülöníthető fotokémiai rendszer (egyes [PSI] és kettes [PSII] fotokémiai rendszer) vesz részt. A PSII-höz kapcsolódó komplex egyedülálló módon képes a víznek protonokká és molekuláris oxigénné való fényindukált elbontására, miközben redukáló ekvivalensek láncolatán keresztül az energia egy része proton elektrokémiai potenciál formájában raktározódik. Ez a potenciál az ATP szintézisének energiaforrásául szolgál. Az energia másik hányada átkerül a PSI-re, ahol újabb foton abszorpciója révén válik a folyamat teljessé a NADP redukcióját eredményezve.

A fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai baktériumokban lényegesen egyszerűbbek, mint a magasabbrendű zöld növényekben. Baktériumokban, a zöld növényektől eltérően, csak egyetlen fotokémiai rendszer (benne a fénygyűjtő antenna és a reakciócentrum fehérje-pigment komplex) működik. A zöld növények lineáris, részben ciklikus elektrontranszportláncával szemben a baktériumoké egyetlen ciklusból áll, melynek során a reakciócentrumban (**RC**) keletkezett töltéspár stabilizálódik. A bíborbaktériumok RC-a a zöld növények PSII fotokémiai rendszerével mutat nagy mértékű hasonlóságot. A fényabszorpciót követően a RC bakterioklorofill dimérje (**P**) gerjesztett szingulett állapotba kerül ($\mathbf{P}^*$). Az alapállapot és a gerjesztett állapot közötti energiakülönbség megegyezik az elnyelt foton energiájával. Ez *Rhodobacter sphaeroides* esetén 1380 meV [1]. Az elektronnak a primér donorról a bakteriofeofitinre (Bfeo) juttatását a bakterioklorofill monomer segíti a primér donor és a bakteriofeofitin, mint akceptor elektronfelhőinek átlapolásával. Ezután az elektron alagúteffektussal jut át az elsődleges kinonra, a peptidváz magrezgései, illetve az áthidaló molekulák (az M252-es triptofán és az M218-as metionin [2, 3]) segítségével. A

fotont abszorbeáló RC-ok több, mint 98%-a eljut ebbe az állapotba, vagyis a fotoszintézis kvantumhatásfoka majdnem egységnyi. Ezzel szemben a fényfelhasználás energia-hatásfoka jóval kisebb, mindössze 30-40 %-os, mivel az energia 60-70 %-a elvész az elektronnak a nem fehérje természetű kofaktorok közötti vándorlás során. A legnagyobb energiaveszteséggel járó folyamat az elsődleges kinon ($\mathbf{Q}_A$) redukálódása, ezzel együtt ez a lépés szükséges *in vivo* körülmények között a töltésszétválasztás irreverzibilissé tételéhez.

A *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium RC-a az elsődleges kinon mellett egy másik kinonmolekulát is tartalmaz (másodlagos kinon, $\mathbf{Q}_B$). A két kinon kémiai szempontból azonos (UQ_{10}), mégis a redox- és a kötési tulajdonságaik eltérést mutatnak [4]. Ennek oka a fehérjekörnyezetük különbözősége [5]. Az elsődleges kinon erősen hidrofób környezetben helyezkedik el, és a RC egyik fehérjealegysége (H-alegység) elszigeteli a vizes fázistól. Emiatt a kinon nem tud protont felvenni a redukciót (elektronfelvételt) követően. A Q_A fiziológiás körülmények között egyszeresen redukálható, kétszeresen redukált formája csak extrém magas fényintenzitás és erősen redukáló körülmények között figyelhető meg [6]. Az elsődleges kinon a környező aminosavakkal és a szerkezeti vizekkel több hidrogénhíd kötést tud kialakítani, és ezáltal igen erősen kötődik a RC-hoz, onnan csak drasztikus eljárással távolítható el [7]. A Q_A/Q_A^- redox pár középponti redoxpotenciálját nemcsak a fehérjekörnyezettel kialakított sztérikus és elektrosztatikus kölcsönhatás befolyásolja, hanem a RC-fehérje és a lipid-membrán közötti kölcsönhatás is.

A másodlagos kinon fehérjekörnyezete ezzel szemben számos poláros aminosavat tartalmaz, melyek elektrosztatikus tere lecsökkenti a Q_B^- energiáját. A kinon állapotban lazán kötődik a RC-hoz, könnyen leválasztható, vagy inhibítorral (pl. o-fenantrolin, terbutrin, stigmatellin) helyettesíthető [8]. Ezzel szemben a szemikinon formája nagyon stabil, 10^{12}-szer hosszabb élettartamú a RC-ban, mint oldatban [9]. *In vivo* körülmények között a Q_B/Q_B^- pár középponti redoxpotenciálja 60 mV-tal pozitívabb, mint a Q_A/Q_A^- páré (pH = 8,0) [10]. A másodlagos kinon teljes redukciója a RC-ban is végbemegy, amely két elektronos, és ehhez csatoltan két proton felvétele járul. Az így képződött dihidro-kinol könnyedén leválik, helyébe a membrán szabad kinonjainak egyike lép [9, 11].

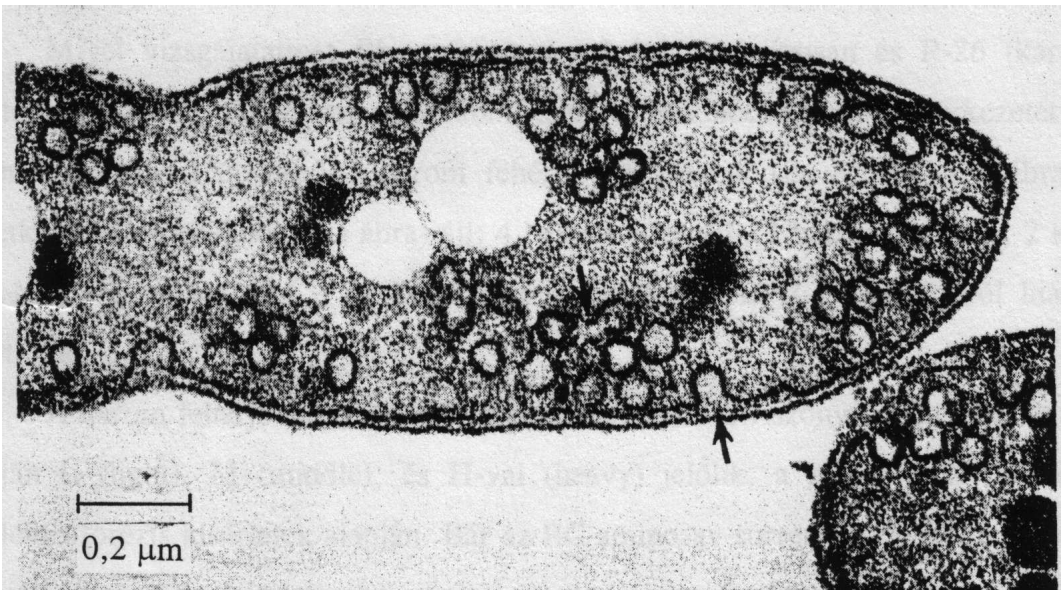
A gerjesztett dimér, a fotokémiai reakció mellett, foton kibocsátásával is visszajuthat az alapállapotba. A bakteriális RC fényemissziója kétféle lehet: prompt és késleltetett fluoreszcencia. Mivel mindkettő a P^* gerjesztett állapot, és a P alapállapot közötti átmenetből ered, így spektrálisan nem lehet megkülönböztetni egymástól. Intenzitásuk és időbeni lecsengésük ellenben alapvetően különbözik: míg a prompt fluoreszcencia a gerjesztés után néhány nanoszekundumon belül lecseng, addig a késleltetett fluoreszcencia mindaddig megfigyelhető, míg a visszreakciók (a $P^+Bfeo^- \rightarrow P^*Bfeo$, a $P^+Q_A^- \rightarrow P^*Q_A$ és a $P^+Q_B^- \rightarrow P^*Q_B$) táplálják [12], és intenzitása nagyságrendekkel kisebb a prompt fluoreszcenciánál. A késleltetett fluoreszcencia lecsengésének sebességállandója megegyezik a töltésszétválasztott állapotok töltésrekombinációs folyamattal való eltűnésének sebességállandójával, ami azt bizonyítja, hogy a késleltetett fluoreszcencia szivárgásból származik [13]. A milliszekundumos tartományba eső késleltetett fluoreszcencia és a prompt fluoreszcencia intenzitásviszonyai alapján meg tudjuk határozni a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot abszolút szabadenergia-szintjét a gerjesztett dimér szabadenergia-szintjéhez képest [14]. Ezt más módszerrel csak közvetve és sokkal kisebb pontossággal lehet megtenni. Mivel a disszertációban a Q_A/Q_A^- redox pár középponti redoxpotenciálját befolyásoló tényezők feltérképezését és megvizsgálását tűztem ki célul, így a bakteriális RC által kibocsátott késleltetett és prompt fluoreszcencia mérése az általam alkalmazott kísérleti spektroszkópiai módszerek közül központi szerepet kapott.

2. fejezet

Irodalmi áttekintés

2.1. Fotoszintetizáló bíborbaktériumok

A bíborbaktériumok fotoszintézisre képes proteobaktériumok. Viszonylag könnyű nevelhetőségük, szaporaságuk, valamint a sejtmembránba ágyazott fotoszintetikus fehérjéiknek egyszerűbb preparálhatósága a fotoszintézis-kutatás egyik kedvelt alanyává teszik őket. Örökítőanyaguk egyetlen kettősszálú, gyűrű alakú DNS, így mutáns tenyészetek létrehozása is könnyebb feladat, mint a magasabbrendű szervezetek esetében, ahol a fotoszintetikus apparátus felépítésében szerepet játszik mind a zöldszíntestben, mind a sejtmagban lévő DNS.

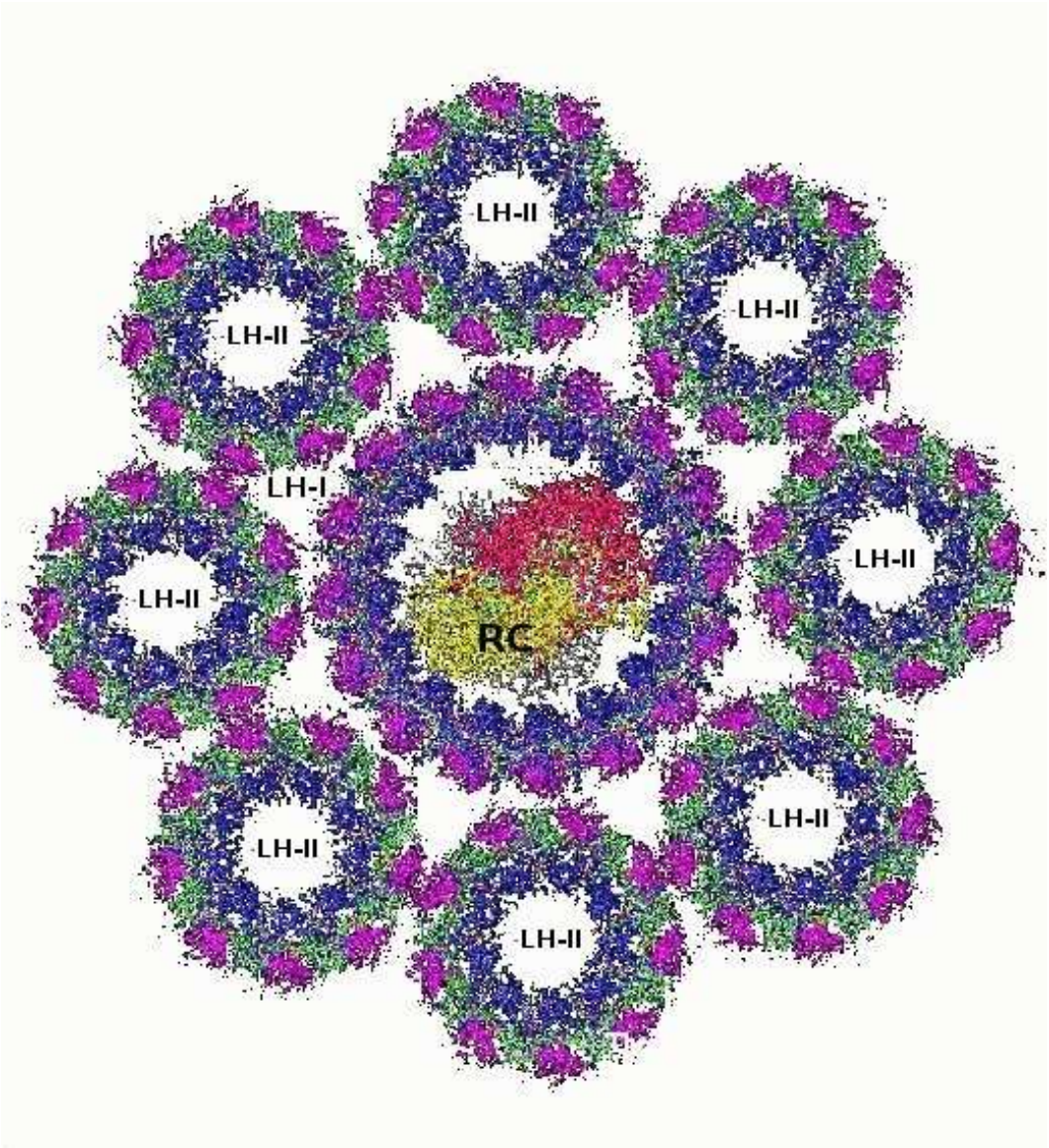


2.1 ábra. *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium elektronmikroszkóppal készített képe. Nyilakkal jelöltük a sejtmembrán betűrődéseit, illetve a befűződött kettős lipidréteggel határolt, apró, gömb alakú vezikulumokat.

A bíborbaktériumok prokarióták, így maghártyával körülhatárolt sejtmagjuk nincs. A sejten belüli membránrendszert a sejtmembrán betűrődései alakítják ki. Ennek a belső membránrendszernek két, intracitoplazmatikus (citoplazma felőli) és extracitoplazmatikus (sejtfelszín felőli) felszíne van. Mivel a sejtben ez az egyetlen membránrendszer (ellentétben

az eukarióta (sejtmaggal rendelkező) szervezetekkel, ahol a különböző sejtalkotók membránjainak integrális fehérjéi funkcionálisan is megosztottak), ezért ebben együttesen benne vannak a fotoszintetikus apparátussal, illetve a légzési lánccal kapcsolatos különböző fehérjék és enzimek. Ezt az intracitoplazmatikus membránt kromatoforának is nevezzük (2.1 ábra.).

A bíborbaktériumok fotoszintetikus apparátusa moduláris felépítésű. A kettős lipidrétegbe ágyazódik be az a legkisebb szerkezeti egység, amely még képes a foton energiáját átmeneti állapotokon keresztül stabil töltéspár szabadenergiájává átalakítani. Ezt a fehérjékből, pigmentmolekulákból és elektron-, illetve protonakceptorként működő kinonmolekulákból felépülő egységet **reakciócentrum**nak (**RC**) nevezzük. A RC-ot antennarendszer veszi körül (2.2 ábra).



2.2 ábra. A bakteriális reakciócentrum és az azt körülvevő antenna-komplex. Jelölések: RC - reakciócentrum, LH-I - egyes fénybegyűjtő rendszer, LH-II - kettes fénybegyűjtő rendszer. (A kép a Theoretical and Computational Biophysics Group, Illinois Állami Egyetem web-oldalán található: `http://www.ks.uiuc.edu/Research/psu/psu.html`)

A kettes fénybegyűjtő rendszer (**LH II**) a perifériku antenna-rendszer, melynek feladata a fény elnyelése, és a gerjesztett állapot átadása az egyes fénybegyűjtő rendszer (**LH I**) és a RC alkotta komplex számára. A közeli infravörös tartományban két darab abszorpciós csúccsal rendelkezik 802 és 854 nm-nél. Maga a pigment-fehérje rendszer kilenc-fokú szimmetriával rendelkezik, váltakozva tartalmaz α és β polipeptideket, melyekhez összesen 27 darab bakterioklorofill-a és 18 darab karotinoidmolekula kötődik. Atomi feloldású háromdimenziós felépítését 1995-ben sikerült megállapítani röntgendiffrakció segítségével [15, 16, 17].

Az LH I rendszer a mag antenna-rendszer, mely a RC-ot öleli körül. Feladata a fény begyűjtése, illetve az LH II által átadott gerjesztett állapot továbbítása a RC bakterioklorofill dimérje felé (pontos leírását lásd. a későbbiekben). Az LH I-nek egy darab abszoprciós csúcsa van 855 nm-nél, mely megegyezik a RC bakterioklorofill dimérjének abszorpciós csúcsával. Háromdimenziós szerkezetének atomi feloldású meghatározása eddig még nem járt sikerrel, de 2003-ban 4,8 Å-ös feloldású strukturális felépítést sikerült meghatározni a RC-LH I komplexről röntgendiffrakció segítségével [18]. A rendelkezésre álló röntgenkristálytani és spektroszkópiai adatok alapján a felépítése hasonló az LH II-höz [19, 20]. Az LH I antenna-rendszer molekulái és a RC bakterioklorofill dimérje közötti távolság 46 Å.

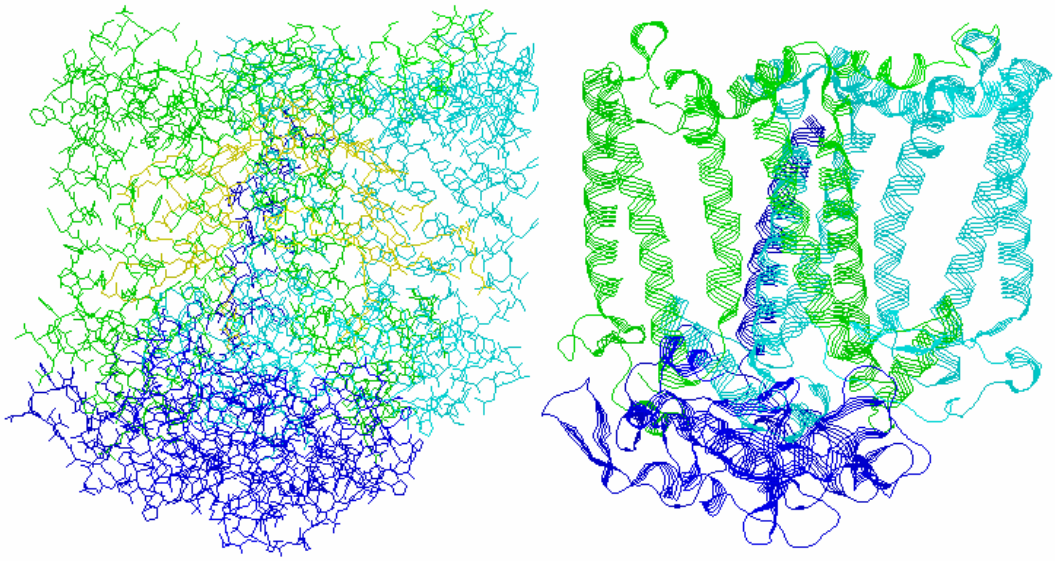
2.1.1. Bakteriális reakciócentrum

A RC létezését már 1932-ben feltételezték [21], de spektrális bizonyítékot csak 1952-ben találtak rá [22], és az 1970-es években sikerült először izolálni a *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktériumból [23, 24].

H. Michel-nek 1982-ben sikerült *Rhodopseudomonas viridis* RC-ból kristályokat előállítani [25], és az azokon már elvégezhető röntgendiffrakciós vizsgálatok segítségével meghatározták a RC szerkezetét 3,0 majd 2,3 Å-ös atomi feloldással [26, 27, 28], melyért 1988-ban Michel, Deisenhofer és Huber Nobel-díjat kapott.

A *Rhodobacter sphaeroides* RC-ának szerkezetéről jelenleg 28 különböző felépítési adatfájl található a brookheaveni fehérje adatbankban (RCSB PDB Protein Data Bank `http://www.pdb.org`). A vadtípuson kívül megtalálhatóak különböző mutánsok [29, 30, 31, 32], lipid molekulákat tartalmazó [33], Cd^{2+} és Zn^{2+} ionokkal [34] gátolt szerkezetek is. Két struktúrát külön is meg szeretnénk említeni, melyek kódjai: 1AIJ (a vadtípus sötét adaptált (neutrális) szerkezete, 2,6 Å-ös atomi feloldással), és 1AIG (a vadtípus megvilágított (töltés szétválasztott állapot) szerkezete, 2,2 Å-ös atomi feloldással) [35]. Ezen szerkezeteket használtuk fel kiindulásként a kvantumkémiai számításainkhoz.

Mivel a vizsgálatainkat *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 vadtípusán és mutánsain, valamint Ga vadtípusán és mutánsain végeztük, ezért a továbbiakban ezen RC-ok szerkezeti felépítését fogjuk ismertetni. A vadtípusú RC három fehérjealegységből épül fel, melyeket elektroforetikus mobilitásuk alapján becsült, egymáshoz viszonyított molekulatömegeik angol elnevezésének kezdőbetűjével L, M és H-val jelölik (light, middle és heavy).



2.3 ábra. A *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium fotoszintetikus RC-ának vázmodell (baloldal) és szalagmodell (jobboldal) ábrázolása. Az ábra a brookheaveni Protein Data Bank 1AIJ jelű struktúrája alapján készült a Rasmol ábrázoló program segítségével. Jelölések: sötétkék szín: H-alegység, világoskék szín: L-alegység, zöld szín: M-alegység, sárga szín: (a baloldali ábrán) nem fehérje típusú kofaktorok. A jobboldali ábrán a RC 11 α-hélixét láthatjuk.

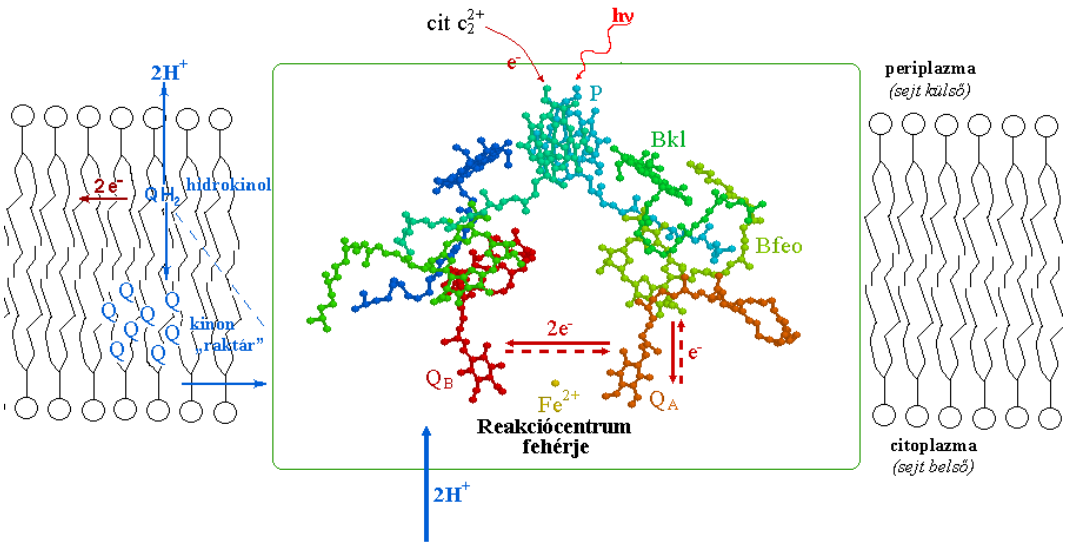
Ez az elnevezés azonban megtévesztő, mivel valójában a H-alegység a legkisebb (27,4 kD), amelyre a RC aminosav sorrendjének meghatározásával derült fény [36]. A H-alegység, mivel kevésbé hidrofób, ezért az SDS poliakrilamid gélen kisebb elektroforetikus mobilitást mutatott, így molekulatömegét nagyobbnak vélték, mint az M- és az L-alegységét. Az utóbbiak molekulatömege 31,3 és 34,3 kD (2.3 ábra).

Az L- és M-alegység 25-35 %-os szekvenciális homológiát mutat, aminosavjainak 70 %-a apoláros, és mindkettőben 5-5 transzmembrán α-hélix van, melyek közül 2-2 különösen szorosan kapcsolódik egymáshoz [37, 38, 39, 40].

Az LM-komplex stabilitását egy nem-hem típusú Fe^{2+} ionnak a négy α-hélix egy-egy hisztidinjével (L190, L230, M219 és M266), valamint az Glu^{M232} aminosavval, mint kétfogú ligandummal képzett hat koordinációs kötése biztosítja [5].

A H-alegységnek egy darab transzmembrán α-hélixe van, globuláris szerkezetű, és az LM-komplex citoplazmikus oldalához kötődik, lezárva ezzel a két kinon kötőhelyet. A H-alegység eltávolítása a két kinon közötti elektrontranszfer gátlását eredményezi [41, 42]. A RC periplazmikus (extracitoplazmikus vagy sejtkülső) oldala (2.4 ábra) a másodlagos elektrondonorként működő, globuláris szerkezetű, vízoldékony citokróm c_2 dokkolóhelye.

A három fehérjealegységen kívül nem fehérje természetű, úgynevezett kofaktorok is részt vesznek a RC felépítésében: 4 db bakterioklorofill (két bakterioklorofill van der Waals kölcsönhatásban van és átlapoló elektronfelhőkkel dimért alkotva képzik a primér donort (**P**), míg a másik kettő (**Bkl**) a dimértől mintegy 5 Å távolságban helyezkedik el majdnem tökéletesen szimmetrikusan), 2 db bakteriofeofitin (**Bfeo**), 2 db kinon ($\mathbf{Q}_A$, $\mathbf{Q}_B$), és a korábban már említett 1 db nem-hem típusú vas ($\mathbf{Fe}^{2+}$) (2.4 ábra).



2.4 ábra. A kofaktorok elhelyezkedése, az elektron és proton útja a bíborbaktériumok fotoszintetikus reaciókcentrumában. Folytonos (piros) nyilakkal az előreirányuló elektrontranszfert, szaggatott (piros) nyilakkal a töltésrekombináció útvonalát jelöltük. Az irányított protontranszfert, illetve a másodlagos kinon átfordulását a (kék) nyilak jelölik. [43]-ban közölt ábra alapján készült az 1AIJ struktúra felhasználásával [35].

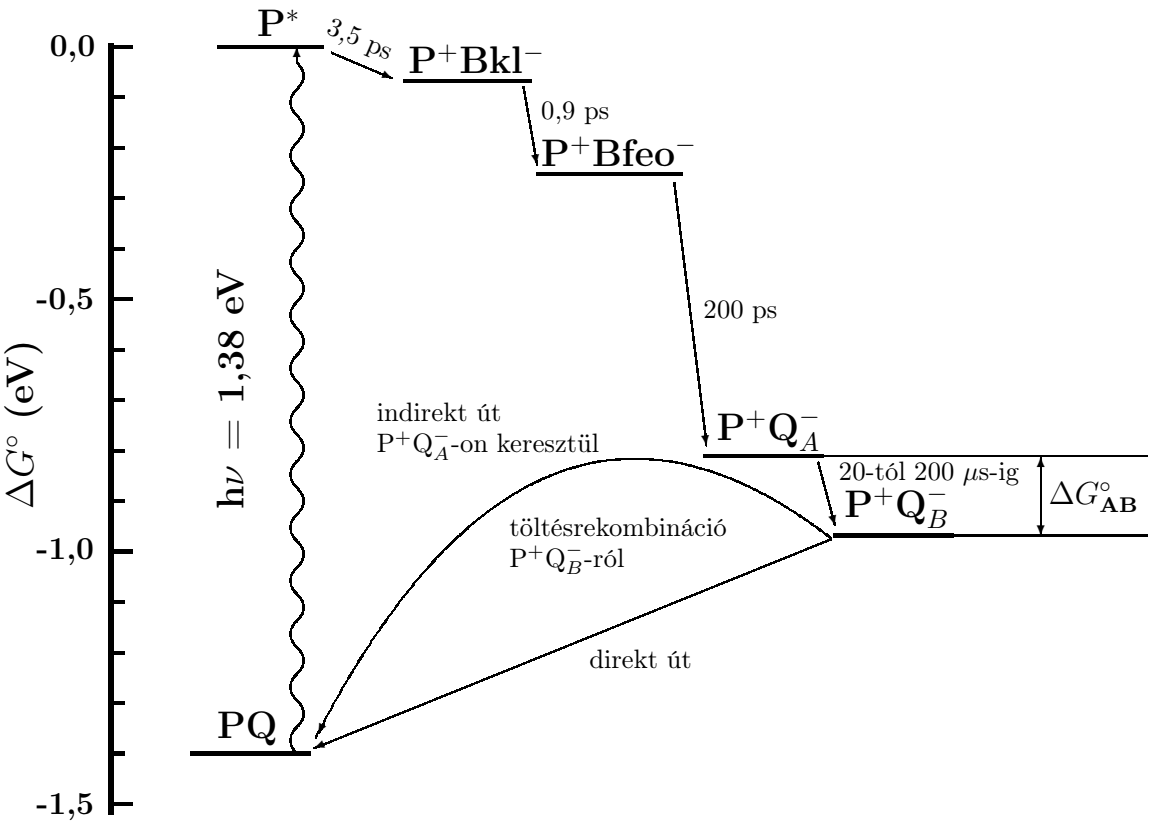
A kofaktorok az LM-komplex hidrofób magjában két, az A illetve a B elnevezésű ág mentén helyezkednek el, és tükörszimmetriát mutatnak a vasatomon és a diméren átmenő, a membránra merőleges síkra nézve. A 2.4.1 és a Ga vadtípusokban jelen van még egy karotinoidmolekula, amely a B-ágban lévő Bkl monomerrel van der Waals kölcsönhatást létesít. Ez a karotinoidmolekula a primér donor triplett állapotának kioltásával hatékonyan megvédi a RC-t a roncsoló fotooxidációtól [44].

A *Rhodobacter sphaeroides*-ben az elsődleges és a másodlagos elektron akceptorok kémiai szempontból azonos kinonmolekulák (ubikinon-10 (2,3-dimetoxi-5-metil-6[10-izoprenoid]-1,4-benzokinon), $\mathbf{UQ}_{10}$).

A szimmetria azonban nem tökéletes, ugyanis az A és B ág funkcionálisan aszimmetriát mutat: fiziológiás körülmények között az elektrontranszfer az A ág mentén legalább hússzor nagyobb hatékonysággal megy végbe, mint a B ágban [45]. Ennek lehetséges okai között szerepelhet 1) a dimér aszimmetriája (a tetrapirol-gyűrűk egyike nem tökéletesen sík), 2) a szomszédos kofaktorok elektronfelhőinek különböző mértékű átlapolása a két ágban (az A ágban közelebb van a Bkl a P-hez és a Bkl a Bfeo-hoz), 3) a fitil (Bkl és Bfeo) és az izoprenoid láncok (kinon) aszimmetriája, 4) a poláros aminosavak különböző eloszlása a két ágban, valamint 5) a vasionnak nem tökéletesen szimmetrikus helyzete a kinonmolekulák között (körülbelül 2 Å-mel közelebb helyezkedik el a B ágban lévő kinonmolekulához).

2.1.2. Elektrontranszfer a bakteriális reakciócentrumban

A fényabszorpciót követően a RC bakterioklorofill dimérje (P) gerjesztett szingulett állapotba kerül (P*). Az alapállapot és a gerjesztett állapot közötti energiakülönbség megegyezik az elnyelt foton energiájával. Ez *Rhodobacter sphaeroides* esetén 1380 meV [1].



2.5 ábra. Az elektrontranszfer kinetikai és energetikai jellemzői *Rhodobacter sphearoides* RC-ban pH = 8,0-nál. A PQ alapállapot, valamint a töltésszétválasztott állapotok szabadenergia-szintjei a gerjesztett dimér szintjéhez képest vannak megadva. A folyamat részletes tárgyalását lásd a szövegben.

A gerjesztett állapotból az első jól elkülöníthető töltéspár (P^+Bfeo^-) közel 3 ps alatt képződik. Az elektronnak a primér donorról a bakteriofeofitinre juttatását a bakterioklorofill monomer segíti a primér donor és a bakteriofeofitin, mint akceptor elektronfelhőinek átlapolásával. Ezt a kvantummechanikai jelenséget szuperkicserélődésnek vagy alagútefektusnak nevezik [43, 46]. Ezt felhasználva Nagarajan és mtsai. nem-adiabatikus [47], Woodbury és mtsai. adiabatikus [48] közelítésben írták le a Bkl monomer szerepét. A legújabb vizsgálatok a monomer aktív részvételét mutatták ki az elektrontranszfer-láncban. Arlt és mtsai. [49] a RC-ok domináns részében (77%) 2,3 ps, a kisebb hányadban (23%) 7 ps életidejű komponenst azonosították a P^+Bkl^- töltéspárral. Az elektron ezután mindkét frakcióban 0,9 ps alatt jutott a bakteriofeofitinre. Az az érdekes helyzet jellemzi az elektrontranszfer legkorábbi szakaszát, hogy egy gyors lépést ($P^* \longrightarrow P^+Bkl^-$) egy még gyorsabb lépés ($P^+Bkl^- \longrightarrow P^+Bfeo^-$) követ. Ez azért szokatlan, mert az elektrontranszfer későbbi szakaszainál az elektron átadás sebessége lépésről lépésre csökken. Kolbasov és Scherz [50] az aktív (A) és az inaktív (B) ágban lévő bakterioklorofill monomer és dimér közötti kölcsönhatást vizsgálták, és azt találták, hogy az aktív ágban 3 nagyságrenddel nagyobb volt a kölcsönhatási energia.

A kialakult töltéspár további, egyre lassuló elektronátadási lépésekkel stabilizálódik. A bakteriofeofitin 80-320 ps alatt redukálja a Q_A elsődleges kinon akceptort, ezzel létrehozva

a $P^+Q_A^-$ töltéspárt [51, 52]. Ez a folyamat szolgáltatja a legnagyobb szabadenergia-csökkenést (ΔG), ami gyakorlatilag irreverzibilissé teszi a töltésszétválasztást. A reakcióval járó szabadenergia-változást a bakterioklorofill dimér milliszekundumos késleltetett fluoreszcenciájából határozták meg: a gerjesztett dimér szintjéhez képest a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiája -860 ± 20 meV (T = 303 K) [14]. Az elektron alagúteffektussal jut át az elsődleges kinonra, a peptidváz magrezgései, illetve az áthidaló molekulák (pl. az M252-es triptofán) segítségével. A fotont abszorbeáló RC-ok több, mint 98%-a eljut ebbe az állapotba, vagyis a fotoszintézis kvantumhatásfoka majdnem egységnyi.

A Q_A és Q_B közötti, egyensúlyra vezető elektronátadás idejét eleinte 100 μs-ban adták meg [53]. Később az elektrokróm változások kinetikai méréseiből azt a következtetést vonták le, hogy a 100 μs)$^{-1}$ körülinek mért kinonok közötti elektrontranszfer sebesség csak átlagos értéknek tekinthető [54]. Szobahőmérsékleten két kinetikai komponens jelenlétét azonosították, amelyeket a heterogénnek feltételezett RC konformációs állapotaihoz rendeltek. Alacsony hőmérsékleten (-20 °C) komponensek sorozatát figyelték meg, így a $Q_A^-Q_B \leftrightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer kinetikáját eloszlásfüggvénnyel adták meg. A kinonok közötti első elektrontranszfer komponenseinek élettartamáról továbbra sem voltak egységesek az álláspontok. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai (**FTIR**) vizsgálattal 200 μs-os komponenst azonosítottak [55]. A szemikinon 398 nm-nél megfigyelhető elektrokróm abszorpcióváltozása alapján 80 μs-os gyors komponenst, és egy meglehetősen változó 200-600 μs-os lassú komponenst észleltek [56]. Utschig és mtsai. [57] 757 nm-nél mérték a szemikinon elektrokróm abszorpcióváltozását, és kis amplitúdójú (25%) 37 μs-os, illetve 10 μs-os [58], valamint nagy amplitúdójú (75%) 230 μs-os komponenseket azonosítottak. Li és mtsai. [59] az elsődleges kinon naftokinonos helyettesítésével, valamint Q_A kötőhely közeli mutáns (M265IT) RC alkalmazásával (melyek segítségével a ΔG^0_{AB}, a $P^+Q_A^-Q_B$ és a $P^+Q_AQ_B^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbséget tudták változtatni) sikeresen azonosították a $P^+Q_A^-Q_B \longrightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer két komponensét. A korábban már mások által leírt 100 μs-os lassabb komponens nem függ a ΔG^0_{AB} szabadenergia-különbségtől, viszont pH-függést mutat pH = 8,0 felett. Az 10 μs-os gyorsabb komponens pH független, ellenben a ΔG^0_{AB}-tól erősen függ: -90-ről -250 meV-ra változtatva a ΔG^0_{AB} szabadenergia-különbséget a gyorsabb komponens 29 μs-ról 0,2 μs-ra gyorsult. A gyorsabb komponens ezenkívül függ a Q_A helyen lévő kinon izoprén láncának hosszától is: növelve a lánc hosszát, csökken a komponens élettartama. A Q_B kötőhelyen lévő kinon izoprén láncának mérete nem befolyásolja egyik komponens élettartamának hosszát sem. Ezekből az az általános következtetés vonható le, hogy a kinonok közötti elektrontranszfer izolált RC-ban több fázisban mehet végbe. A leggyorsabb fázis a direkt elektrontranszfert írja le, azaz azt az elektront átadást, amely optimalizált szerkezetben és környezetben játszódik la. Ekkor az elektrontrnaszfer sebessége csak a hajtóerőtől ($\Delta G_{Q_A^-Q_B-Q_AQ_B^-}$) függ. A lassabb komponensek szerkezeti és proton/ion relaxációtól függnek (ezeket a folyamatokat tükrözik), és ezért mutathatnak a körülményektől ennyire változó képet.

Kromatoforán a megfigyelt elektrontranszfer gyorsabb, mint egy izolált RC-ban: egy 4 μs-os (60%) és egy 80 μs-os (40%) komponenst írtak le [60], egyetértésben azzal, hogy a két kinon közti középponti redoxpotenciál-különbség (azaz az elektrontranszfer hajtóereje) nagyobb kromatoforában, mint izolált RC-ban. Kromatoforában a környezet töltés és proton-átrendeződésének kisebb szerep jut a kinonok közti elektrontranszfer meghatározásában.

2.1.3. Kinonok energetikája, fotociklus

A *Rhodobacter sphaeroides*-ben a két kinon kémiai szempontból azonos (UQ_{10}), mégis a redox és a kötési tulajdonságaik eltérést mutatnak [4]. A fehérjekörnyezetük különbözősége alapján lehet értelmezni ezen eltéréseket [5]. Az elsődleges kinon erősen hidrofób környezetben helyezkedik el, és a H-alegység elszigeteli a vizes fázistól. Így a kinon nem tud protont felvenni a redukciót követően. Fiziológiás körülmények között a Q_A egyszeresen redukálható, csak extrém magas fényintenzitás és erősen redukáló körülmények között figyelhető meg kétszeresen redukált formája [6]. A környező aminosavakkal és szerkezeti vizekkel több hidrogénhíd kötést tud kialakítani, és ezáltal igen erősen ($\Delta G_{\text{kötési}}(UQ_4) = 13{,}1$ kcal/mol a Q_A helyre [61]) kötődik a RC-hoz, csak drasztikus eljárással (1-4% LDAO és 1-10 mM o-fenantrolinnal) távolítható el [7]. Szemikinon alakja nagyon stabil: a redukciós szabadenergia-változás lényegesen pozitívabb a Q_A kötőhelyen, mint apoláros oldószerben [9, 62].

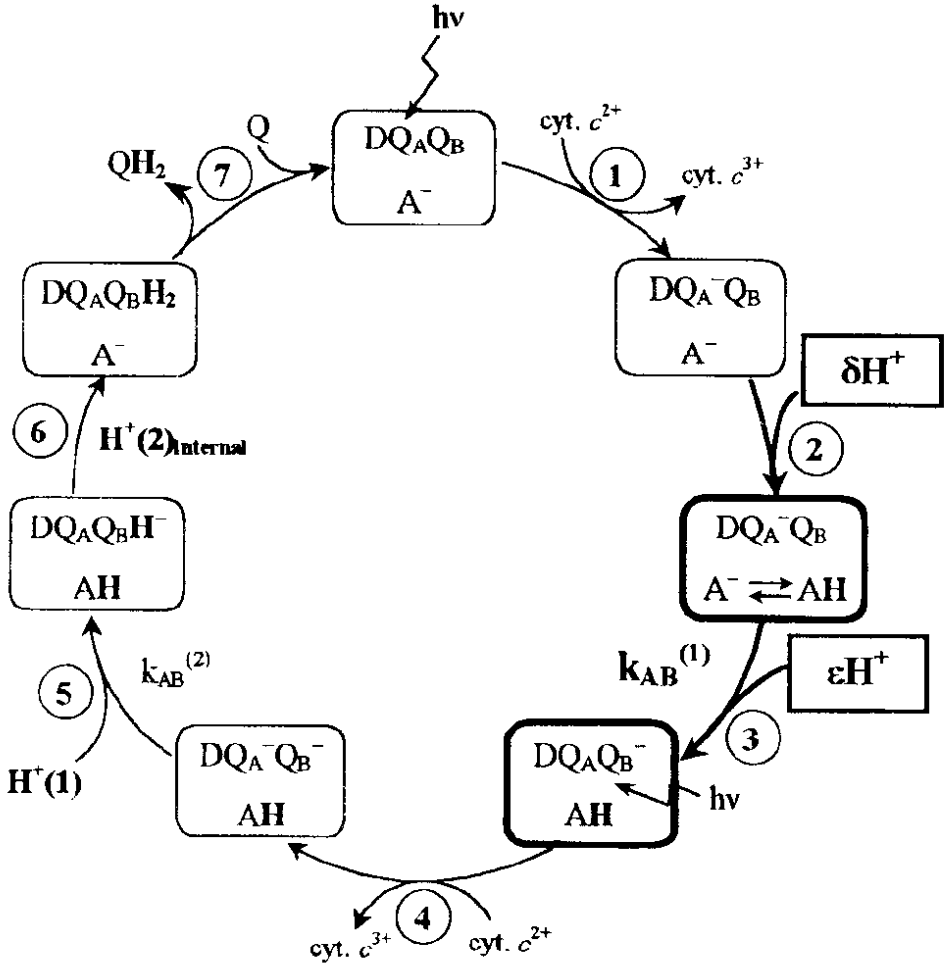
A másodlagos kinon fehérjekörnyezete ezzel szemben számos poláros aminosavat tartalmaz (Glu^{L212}, Asp^{L213}, Asp^{L210}, Arg^{L217} és Ser^{L223}), ezek elektrosztatikus tere csökkenti le a Q_B^- energiáját. A kinon forma lazán kötődik a RC-hoz ($\Delta G_{\text{kötési}}(UQ_4) = 11{,}8$ kcal/mol a Q_B helyre [61]), könnyen leválasztható, vagy inhibítorral (pl. o-fenantrolin, terbutrin, stigmatellin) helyettesíthető [8]. Szemikinon formája szintén nagyon stabil, 10^{12}-szer hosszabb élettartamú a RC-ban, mint oldatban [9]. *In vivo* körülmények között a Q_B/Q_B^- pár középponti redoxpotenciálja 60 mV-tal pozitívabb, mint a Q_A/Q_A^- páré (pH = 8,0) [10]. Ezt a különbséget más mérésekkel is alátámasztották. Késleltetett fluoreszcencia méréssel $P^+Q_A^-Q_B$ és a $P^+Q_AQ_B^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbséget 78 ± 8 meV-ban állapították meg [14], és ezzel összhangban voltak a két állapot lecsengésének kinetikájából kapott eredmények is [63, 64]. A másodlagos kinon teljes redukciója a RC-ban is végbemegy, amely két elektronos, és ehhez csatoltan két proton felvétele járul. Az így képződött dihidro-kinol könnyedén leválik, helyébe a membrán szabad kinonjainak egyike lép [9, 11].

Bár a másodlagos kinont a primér kinon szabadenergia-csökkenéssel redukálja, az elektrontranszfer nem spontán megy végbe, hanem 560 meV (termikus) aktiválási energia szükséges hozzá [63, 65]. A Q_B redukálásához a körülötte lévő dipóloknak át kell rendeződniük, amely a $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbségnél sokkal nagyobb reorganizációs energiát igényel, és ezt kell a viszonylag nagy aktiválási energiának fedezni.

A Q_A felé irányuló elektrontranszfernek gyorsnak kell lennie, hogy a töltésszétválasztás energiája csapdázódjon, és ne következzen be töltésrekombináció. A Marcus elmélet szerint [43, 46] az elektrontranszfer sebessége akkor maximális, ha a reorganizációs energia megegyezik a reakció szabadenergia-változásával. A reorganizációs energiát viszont a poláros aminosavak jelenléte növeli, ami az optimumtól való eltávolodást, ezzel kisebb kinon redukciós sebességet hoz létre, tehát az optimális energiacsapdázódáshoz és protonszállításhoz különböző környezet szükséges. Így megállapíthatjuk, hogy a RC-ban két különböző fehérjekörnyezetű kinonra van szükség ahhoz, hogy a protontranszfer is létrejöjjön, és az energia is jó hatásfokkal csapdázódjon [66].

A $P^+Q_AQ_B^-$ végső töltéspár elektrosztatikus energiája nem alakítható át direkt módon kémiai energiává, így ATP szintézisre közvetlenül nem használható. A kemiozmotikus elmélet [67] szerint ehhez membránon keresztüli protongradiens szükséges, amely (foto)ciklusba szerveződött reakciók sorával érhető el. *In vivo* körülmények között az oxidált dimért *Rhodobacter sphaeroides* esetében mobilis vízoldékony citokróm c_2 gyorsan (1 μs alatt) képes redukálni (2.6 ábra (1) lépés). Ezzel a töltésrekombináció valószínűsége elhanyagolhatóvá válik fiziológiás körülmények között. A $P^+Q_A^-$ töltéspár kialakulásával a citoplazmikus oldalon pH-tól függően a RC szubsztöchiometrikus mértékben protonálódik [64, 68, 69, 70]

(2.6 ábra (2) lépés). A $Q_A^- Q_B \longrightarrow Q_A Q_B^-$ elektrontranszfer hatására további (0,1 H^+/RC) protonkötés figyelhető meg (2.6 ábra (3) lépés). A protont a Q_B környezetében elhelyezkedő Glu^{L212} aminosav veszi fel [71]. A Q_A oxidációja után a RC egy része újabb töltésszétválasztásra válik alkalmassá, miután funkcionális Q_B jelenlétében az elektron eljut a másodlagos kinonra. A RC-ok másik részében az elektron a Q_A-n marad. A Q_A és Q_B közötti elektronmegosztást az egyelektronos egyensúlyi állandó (K_e) adja meg, és mivel ez semleges pH-n igen nagy (K_e = 10-15, [53]), a RC-ok többségében a második fényfelvillanást követő citokróm oxidáció után két elektron kerül a kinon akceptor-rendszerbe ($Q_A^- Q_B^-$) (2.6 ábra (4) lépés).



2.6 ábra. A kinon redukciós ciklusa *Rhodobacter sphaeroides* RC-ában [71]. A cit c_2 donor fénygerjesztést követően redukálja a bakterioklorofill dimert (D) (1. lépés). A 2. és 3. lépésben a RC redox állapotától függően szubsztöchiometrikus mennyiségű protont köt meg. Egy újabb gerjesztést követően (4. lépés) a Q_B a citoplazmából felvesz egy protont, aminek hatására a 2. elektrontranszfer végbemegy (5. lépés). A Q_B második protonját a Glu^{L212}-tel veszi el, ami a 2. és 3. lépésekben újra pótlódik (6. lépés). Végül a keletkező dihidro-kinol leválik, és helyére egy új kinon köt be (7. lépés).

A második elektron átvitele csak a szemikinon protonálódása után megy végbe [72], *in vivo*

körülmények között a szemikinon nagyon gyors egyensúlyi protonációját követi a lassabb elektrontranszfer (proton-aktivált elektrontranszfer [73, 74, 75]). A RC a protont a citoplazmikus fázisból (bulk) veszi fel (2.6 ábra (5) lépés). A Q_B a második protonját viszont nem az oldatból veszi fel, mint azt sokáig gondolták, hanem a Glu^{L212} által a 2. és 3. lépés során megkötött proton jut a Q_B-re [71] (2.6 ábra (6) lépés). Ezzel a lépéssel a RC eredeti töltéseloszlása helyreáll. A reakció eredményeképpen dihidro-kinol (Q_BH_2) keletkezik, amely lényegesen lazábban kötődik a RC-hoz, mint a szemikinon, leválik, és helyét a kinon raktárból egy másik kinon foglalja el (2.6 ábra (7) lépés) [11]. A kinon fotokémiai redox ciklusa igen rövid (1 ms), amelyet a mobilis kofaktorok (citokróm c_2) pH-függő redox ciklusa jelentősen befolyásol [76]. A Q_B^- által felvett második elektron és az ezzel csatolásban álló protonfelvétel részfolyamatai sokáig tisztázatlanok voltak. Korábban úgy vélték, hogy először $Q_AQ_B^{2-}$ állapot alakul ki, és ezután következik mindkét proton felvétele [77]. Későbbi eredmények már rámutatnak arra, hogy a $Q_A^-Q_BH$ állapot bizonyos körülmények között energetikailag stabilabb [78]. A kérdést végül Graige és mtsai. [72] hibrid RC-ok (Q_A helyen naftokinon származékok, Q_B helyen ubikinon) vizsgálatával (driving force assay) döntötték el, az utóbbi feltevés javára.

2.1.4. Veszteségi folyamatok

Az energiahasznosító folyamatok mellett a gerjesztett állapotú primér donor (P^*) veszteségi folyamatok révén is visszakerülhet alapállapotba. Mivel az elő rendszerekben, ahol ahol a komponensek és a folyamatok erősen csatoltak, az energiahasznosító folyamatok hatásfoka magas, ezért a velük versenyező veszteségi folyamatok kis valószínűséggel következnek be [12]. A veszteségi folyamatok közül három játszik lényeges szerepet: töltésrekombináció, hőleadás, és fluoreszcencia.

Töltésrekombináció

A P^+Bfeo^- állapotból történő töltésrekombináció időállandóját olyan RC-okban lehet meghatározni, amelyekben a Q_A-hoz irányuló elektrontranszfer a Q_A előzetes redukciója, vagy hiánya (kinon-mentesítés) miatt gátolt. *Rhodobacter sphaeroides* esetén, szobahőmérsékleten a töltésrekombináció élettartama a redukált bakteriofeofitinről csupán 12 ns [79, 80]. A rekombináció három feltételezett úton történhet: 1) A RC-ok 90%-a a $Bfeo^-$-ról a P^+-ra történő elektrontranszferrel rekombinálódik. Ez a folyamat hasonlít az előre irányuló elektrontranszferhez, ellenben más molekulapályák vesznek részt benne. 2) 5-10%-ban a dimér triplett állapotba kerül, és a rekombináció onnan következik be. Alacsony hőmérsékleten ez a folyamat dominál. 3) A RC-ok elenyésző mennyisége esetében a primér donor újra gerjesztett állapotba kerül, és onnan jut alapállapotba. Ennek a rekombinációs útnak a valószínűsége azonban a mutánsokban magasabb, ahol a P^* gerjesztett állapot és a P^+Bfeo^- állapot közötti szabadenergia-különbség kicsiny [52].

Ha az elektrontranszfer a Q_A és Q_B között gátolt (pl. inhibítort ültetünk be a Q_B kötőhelyre), akkor a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot szobahőmérsékleten körülbelül 100 ms-os időállandóval rekombinálódik [63, 81, 82]. Alacsony hőmérsékleten (77 K) ez az élettartam 30 ms-ra gyorsul [83]. *In vitro* körülmények között, így kísérleteink során is, a töltésrekombináció valószínűsége megnövekszik, mivel a másodlagos elektrondonor, a vízoldékony citokróm c_2, hiányzik. A $P^+Q_B^-$ töltésszétválasztott állapotról történő rekombináció pH = 8,0-nál, szobahőmérsékleten 1 s [63]. Látható, hogy ez lényegesen hosszabb rekombinációs idő, mint amit a $P^+Q_A^-$ állapotban megfigyeltünk. Egy lehetséges magyarázat szerint a másodlagos kinon körüli nagyszámú poláros csoport, illetve a fehérje belsejébe irányuló töltésvezetésre alkalmas út hiánya gátolja a közvetlen Q_B-ről történő rekombinációt, így ez

indirekt módon, a Q_A-n keresztül megy végbe [84]. Ha nagyon mély a $P^+Q_B^-$ csapdaállapot, akkor direkt visszreakciót is tapasztalhatunk [84].

Amennyiben töltésrekombinációkhoz kapcsolódó időtartamokat összevetjük a komponenseknek megfelelő előre irányuló, fotoszintézis szempontjából hasznos elektrontranszfer lépésekkel, akkor azt kapjuk, hogy a rekombinációs lépések 2-3 nagyságrenddel lassabbak. Ez a nagy különbség teszi lehetővé, hogy a stabilizált, végső töltéspár keletkezésének kvantumhatásfoka maximum körüli érték, ennek azonban a stabilizáció során jelentős (60-70%-os) energiaveszteség az ára [37].

Hőleadás

A dimér gerjesztési energiáját hő formájában is leadhatja a környezetnek, fokozatosan a rezgési energiaszintek rendszerén keresztül. A hőleadás mértéke a fotoakusztikus spektroszkópia segítségével detektálható, mely technika lehetővé teszi a fényindukált folyamatok során keletkező térfogat- és entalpia-változások meghatározását. A fotoakusztika egyik kulcskérdése a gerjesztési energia hőként felszabaduló részének elválasztása a csak térfogatbeli változásokat adó hosszú élettartamú köztes termékek jelétől [85, 86]. Maga a mérési technika hosszú fejlődésen ment keresztül, napjainkban hangolható festéklézereket használnak gerjesztő fényforrásként, és a fotoakusztikus jelek detektálására a piezoelektromos elven működő hidrofonokat alkalmaznak, melyek közvetlen kontaktusban állnak a vizsgált RC mintával [87, 88, 89, 90, 91]. A kezdeti nehézségek ellenére (a fotoakusztikus jeleket igen nehéz a szisztematikus hibáktól mentesíteni) a fotoakusztika a fotoszintetikus folyamatok vizsgálatának egyik fontos eszközévé vált.

Fluoreszcencia

A gerjesztett dimér foton kibocsátásával is visszajuthat alapállapotba. A bakteriális RC fényemissziója kétféle lehet: prompt és késleltetett fluoreszcencia. Mivel mindkettő a P^* gerjesztett állapot, és a P alapállapot közötti átmenetből ered, így spektrálisan nem lehet megkülönböztetni egymástól. Intenzitásuk és időbeni lecsengésük ellenben alapvetően különbözik: míg a prompt fluoreszcencia a gerjesztés után néhány nanoszekundumon belül lecseng, addig a késleltetett fluoreszcencia mindaddig megfigyelhető, míg a visszreakciók (a $P^+Bfeo^- \rightarrow P^*Bfeo$, a $P^+Q_A^- \rightarrow P^*Q_A$ és a $P^+Q_B^- \rightarrow P^*Q_B$) táplálják [12], és intenzitása nagyságrendekkel kisebb a prompt fluoreszcenciánál.

Mivel vizsgálatainkban a bakterioklorofill dimér késleltetett fluoreszcenciája központi szerepet játszik, ezért külön fejezetben tekintjük át ennek irodalmi hátterét.

2.2. Késleltetett fluoreszcencia

Minden fotoszintetizáló szervezet a megvilágítását követően hosszabb idővel is képes fényt kibocsátani. Ezt a késleltetett fényemissziót először spenótból izolált zöldszíntesten sikerült Strehlernek és Arnoldnak megfigyelnie 1951-ben [92]. Röviddel ezután, 1955-ben Arnold és Thompson [93] azt tapasztalták, hogy a bíborbaktériumok közül a *Rhodospirillum rubrum*, a *Rhodopseudomonas gelatinosa*, és a *Rhodopseudomonas palustris* is ad késleltetett fluoreszcencia fényt, de lényegesen kisebb intenzitással, mint a magasabbrendű növények és algák.

A különböző hullámhosszakon alkalmazott gerjesztés mellett felvett akciós spektrumok alapján Goedheer [94, 95] arra a következtetésre jutott, hogy ezek a spektrumok megegyeznek a bakterioklorofill gerjesztett szingulet állapotához (mely állapot a megvilágítás végét

követően alakul ki) tartozó emissziós spektrummal. 1965-ben Clayton és Bertsch *Rhodopseudomonas sphaeroides* mutánson végzett mérései [96] szolgáltatták az első kézzelfogható bizonyítékot arra, hogy a baktérium által kibocsátott fluoreszcencia fényhez mindenképpen szükséges működőképes RC jelenléte, az antenna-bakterioklorofill jelenléte önmagában nem elégséges. A fotoszintetikus baktériumok késleltetett fluoreszcenciájáról szóló első részletes tanulmány Clayton nevéhez fűződik [97].

Ebben a munkában Clayton a *Chloropseudomonas ethylica* zöld fotoszintetikus baktériumot vizsgálta. Azt találta, hogy az emittált prompt fluoreszcencia két elkülöníthető komponensből áll. Az állandó nagyságú komponens azon antenna-rendszerhez tartózó klorofilloktól származik, amelyek nem állnak direkt vagy indirekt módon energiatranszfer kapcsolatban a RC-okkal. A másik (a megvilágítás során változó intenzitású) komponens, pedig a RC elsődleges elektron donorjának és akceptorának redoxállapotát tükrözi. Emellett a változó intenzitású prompt fluoreszcencia komponens spektruma megegyezett a késleltetett fluoreszcencia spektrumával.

Carithers és Parson 1975-ben *Rhodopseudomonas viridis* kromatoforán végeztek késleltetett fluoreszcencia vizsgálatokat [98, 99]. Inhibítor (o-fenantrolin) segítségével gátolták az elsődleges és a másodlagos kinon közötti elektrontranszfert, és így sikerült kimutatniuk, hogy a bakterioklorofill dimér által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia az elsődleges töltésszétválasztás fordított folyamatából keletkezik. Redoxtitrálás segítségével megállapították, hogy a késleltetett fluoreszcencia maximuma $E_h = +420$ mV-nál mérhető [98, 100]. Magasabb potenciáloknál a rendszer fotokémiai aktivitásának csökkenését figyelték meg, mivel a primer donor már sötétben, a gerjesztő fényfelvillanás előtt oxidálódott. Alacsonyabb értékeknél, pedig a membránhoz kötött redukált állapotú citokrómok gátolták meg a késleltetett fluoreszcencia keletkezését a P^+ flash utáni gyors visszaredukálásával. Ezen okok miatt kormatoforánál nagyon fontos megadni az aktuális redoxpotenciál értékét, mert csak a prekurzoroknak megfelelő nagyon szűk sávon belül mérhetünk késleltetett fluoreszcenciát.

A fotoszintetizáló szervezetek által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia fény széles időskálát (ns-tól a néhány perces időtartományig), és nagyon változó intenzitást fed le. A késleltetett fluoreszcencia alapvetően az oxidáló (lyukak) és redukáló (elektronok) ekvivalensek (1) populációitól, (2) csapdamélységétől és (3) rekombinációjuk sebességétől, valamint azon hatásfokoktól függ, amelyek a pigment gerjesztett szingulet állapotának kialakulásához és a fénykibocsátáshoz vezetnek [101].

Az 1980-as években Parson és mtsai. kezdtek el foglalkozni a *Rhodobacter sphaeriodes* bíborbaktérium RC-ának késleltetett fluoreszcenciájával [14]. Az izolált RC mintáknál az egyik fő nehézséget a fluoreszcencia hatásfoka jelenti, amely rendkívül kicsiny: $4 \pm 1{,}5 \cdot 10^{-4}$ [102]. Ennek ellenére a gerjesztett állapotú bakterioklorofill dimér (P^*) által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia mérése egy nagyon érzékeny módszer a töltésstabilizáció során kialakuló redox párok szabadenergia-szintjeinek különböző körülmények következtében bekövetkező változásának nyomonkövetésére [62, 14, 79, 103]. A prompt és késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával, pedig meghatározhatóvá vált a kialakult stabil töltéspárok *in situ* abszolút szabadenergia-szintjei is [14].

Olyan RC-ban, ahol az elsődleges kinonra történő elektrontranszfer gátolt, a P^*Bfeo állapot a gerjesztést követően igen hamar (pár ps alatt) termikus egyensúlyba kerül a P^+Bfeo$^-$ töltésszétválasztott állapottal, emiatt a RC-ok igen kis hányada állandóan a P^*Bfeo állapotban lesz (dinamikus egyensúly). A késleltetett fluoreszcenciát ezek a RC-ok fogják kibocsátani, melynek intenzitásából közvetlenül meghatározható a gerjesztett dimér és az első stabil töltéspár közötti szabadenergia-különbség (ΔG). Woodbury és Parson 1984-ben 160 és 240 meV közötti ΔG értéket határozott meg [103]. A bizonytalanság oka a mért

fluoreszcencia intenzitásának összetett időfüggésében keresendő (legalább három kinetikai komponens van jelen: 3,2; 9,7 és 11 ns-os időállandókkal).

A második stabil töltéspár ($P^+Q_A^-$) kialakulása ellenben jóval nagyobb szabadenergia-csökkenést okoz, ezért ennek az állapotnak az energetikája jelentősen befolyásolja a fotokémiai hatásfok értékét, és az elektronvándorlás kinetikáját. A P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbséget a P^* állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapotból való termikus repopulációjából származó késleltetett fluoreszcencia intenzitásból határozták meg (az elsődleges és a másodlagos kinon közötti elektrontranszfer inhibítorral volt gátolva): 860 ± 20 meV 303 K hőmérsékleten [14, 103]. Később Túrzó és mtsai. *Rhodobacter sphaeroides* esetében pH = 8,0-nál 910 ± 20 meV szabadenergia-különbséget határoztak meg a P^* és $P^+Q_A^-$ állapotok között [104]. Összevetve a P^+Bfeo^- és a P^*, valamint a $P^+Q_A^-$ és P^* állapotok közötti szabadenergia-különbséget megállapíthatjuk, hogy a $Bfeo^-$ és a Q_A közötti elektrontranszfer okozza a legnagyobb, ≈ 670 meV-os energiaveszteséget.

A késleltetett fluoreszcencia intenzitásának hőmérsékletfüggése fontos információkat ad a töltésszétválasztás termodinamikai paramétereiről [62, 14, 104]. Ilyen mérések alapján határozták meg az elsődleges kinonra történő elektronátadás folyamatához kapcsolódó entalpia-változás mértékét: ΔH = 750 meV a P^* energiaszintjéhez viszonyítva [14]. Turzó és mtsai. pH = 8,0-nál *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium izolált RC-ra ΔH = 820 ± 40 meV-ot adtak meg a P^* szintjéhez képest [104].

A gerjesztett dimér (P^*) és a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot közötti szabadenergia-különbséget meghatározták olyan RC-ban is ahol a Q_A kötőhely natív ubikinonját más kinonmolekulákra cserélték [62]. Ezek a szubsztituensek megváltoztatták a Q_A/Q_A^- redox pár középponti redoxpotenciálját. Az ubikinon potenciáljához képest magasabb (redukálóbb) potenciálú analógokat alkalmazva a $P^+Q_A^-$ állapot energiaszintje közelebb került a P^*-hoz, megnövelve ezáltal a P^* termikus repopulációjának valószínűségét, ami a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának növekedését eredményezte. Ezek a kísérletek szintén a késleltetett fluoreszcencia mérések előnyeire mutatnak rá a szabadenergia-szintek meghatározásában.

Más kísérleti eljárásokkal szemben (redoxtitrálás, protonációs vizsgálatok, töltésrekombinációs vizsgálatok) a késleltetett fluoreszcencia mérés egy direkt módszer a RC-on belül kialakult stabil töltéspárok szabadenergia-szintjeinek a meghatározásához.

3. fejezet

Célkitűzés

A legfontosabb célom az volt, hogy az elsődleges kinonhoz közeli aminosavak mutációjával olyan RC-okat hozzunk létre, amelyekben a Q_A termodinamikai tulajdonságait befolyásoló, a fehérjekörnyezettel kialakított sztérikus és elektrosztatikus kölcsönhatásokat meghatározhassam, és jellemezhessem. Ehhez a primér donor által kibocsátott prompt és késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával meg fogom határozni a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbséget vadtípusú és mutáns RC-okban. Ennek segítségével meghatározom a Q_A/Q_A^- redox pár *in situ* középponti redoxpotenciálját adott RC-fehérjében.

A röntgenkrisztallográfiai adatok alapján meghatározott atomi feloldású RC szerkezet lehetőséget nyújt a mutációk okozta változások termodinamikai jellemzőinek számítógépszimulációval való nyomonkövetésére. Dokkolási szimulációval meg fogom adni a kinon- és egyszeres negatív töltéssel rendelkező szemikinonmolekula kötési szabadenergiáját vadtípusú és mutáns RC-okban, és ennek segítségével becslést fogok adni a Q_A/Q_A^- redox pár középponti redoxpotenciáljára. Emellett a szabadenergia perturbáció módszerének segítségével modellezni fogom az elsődleges kinonmolekula redukálódásának folyamatát vadtípusú és mutáns RC-okban.

A kardiolipin (difoszfatid-glicerol), mint modell-lipid felhasználásával a reakciócentrum-fehérje és a lipidkörnyezet közötti kölcsönhatást fogom vizsgálni. Tanulmányozni fogom, hogy milyen hatást fejt ki a töltésrekombinációs folyamatokra, valamint hogyan befolyásolja a kialakult töltéspár ($P^+Q_A^-$) szabadenergia-szintjét a gerjesztett primér donor energiaszintjéhez képest.

Membrán fragmentumba (kromatofora) ágyazott RC késleltetett fluoreszcenciájának vizsgálatával további információkat fogok gyűjteni a reakciócentrum-fehérjének és a lipidmembránnak a Q_A-ra gyakorolt hatásáról. Emellett jellemezni fogom az izolált kromatofora által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia lecsengés összetett kinetikáját, valamint az új kinetikai komponens tulajdonságait.

4. fejezet

Anyagok és módszerek

A vizsgálatainkat részben izolált RC-fehérjében, részben kromatoforán végeztük. Ezekhez a *Rhodobacter sphaeroides* fotoszintetizáló bíborbaktérium 2.4.1 vadtípusát, a belőle készített CYCA1 citokróm c_2 mentes mutáns [105], és a *Rhodobacter sphaeroides* R-26 vadtípusú törzset használtuk fel. Az elsődleges kinon akceptor redoxpotenciál eltolódásának vizsgálataihoz a *Rhodobacter sphaeroides* Ga vadtípusból készített Q_A közeli mutánsokat használtunk, melyekből izolált RC-ot tisztított állapotban Prof. Colin A. Wraight (Uversity of Illinois, Biophysics and Plant Biology Center for Biophysics and Computational Biology, Urbana-Champaign, Amerikai Egyesült Államok) csoportjától kaptuk lefagyasztott állapotban. A mutáns RC-okat két csoportra lehet osztani. Egyik részük az M265-ös izoleucin reziduum módosításával készült (Kunkel által leírt eljárás alapján [106, 107]). Az izoleucint valinra, szerinre és treorinre cserélték le pontmutáció segítségével [108]. A másik csoportot alkotják az M218-as metionin módosításával készült M218MA ($\mathrm{Met}^{M218} \rightarrow Ala$) és M218MG ($\mathrm{Met}^{M218} \rightarrow Glu$) mutánsok. Ezeket Stratagene QuickChange pontmutációs mutagenézis rendszer segítségével állították elő [108].

4.1. Baktériumok tenyésztése

4.1.1. CYCA1 törzs

CYCA1 citokróm c_2 mentes mutáns törzset szukcinát tartalmú folyadékkultúrában (Sistrőm-féle médium, [109]) szemi-anaerob körülmények között tenyésztettük [110]. Kiindulásként masszív szúrt tenyészetekből oltottunk sejteket folyékony tápoldatot tartalmazó lezárható kémcsövekbe. Mivel a CYCA1 mutáns kanamycin rezisztens, ezért (megőrzendő a tenyészet tisztaságát) a Sistrőm tápoldathoz kanamycin antibiotikumot adtunk 25 mg/ml mennyiségben. Az antibiotikumot csak az előzőleg felforralt, szobahőmérsékletűre visszahűlt tápoldathoz, sterilizált pipetta alkalmazásával adagoltuk. A 10 cm^3 térfogatú kémcsöveket 3/4-ig töltöttük meg (szemi-anaerob körülmények), majd lezártuk azokat. A mutáns tenyészet heterotróf nevelést igényel, ezért fénytől elzárva tartottuk 32 ± 2 °C hőmérsékleten. A tenyészet csak kis felületen érintkezett a bezárt levegővel, ezért rázógépet alkalmaztunk a megfelelő keveredés eléréséhez.

A kései logaritmikus fázisba jutott tenyészeteket használtunk inokulumként a kromatofora preparálásához szükséges nagy térfogaton történő szaporításhoz. A 80-100 g vizes sejttömeg eléréséhez 6-8 db 1 literes üvegedényben rázógépen folyamatosan rázatva szemi-anaerob körülmények között tenyésztettük a sejtkultúrát. A sejteket lecentrifugáltuk (8000 g, 10 perc), Tris-pufferrel (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH = 8,0) többször átmostuk, és újbóli centrifugálás után további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Az oldatok, illetve a

minták pH értékét kalibrált kombinált üvegelektródával mértük (Orion, 91-03 típus).

4.1.2. R26 törzs

Rhodobacter sphaeroides bíborbaktériumokat fotoheterotróf módon, levegőtől elzárva Siström tápoldatban [109] neveltük. Az R-26 mutáns esetében az átoltást követően a megvilágítás előtt a sejteket 5-8 órán keresztül sötétben tartottuk, hogy a tápoldatban oldott oxigén a sejtlélegzés során felhasználódjon [64]. A bíborbaktériumok növekedéséhez szükséges megvilágítást wolfram szálas izzók szolgáltatták, amelyek emissziója a közeli infravörös színképtartományba esik, ahol a baktériumok jól abszorbeálnak. A megvilágítás erősségét az alkalmazott izzók teljesítményének és geometriai elrendezésének megválasztásával 90-100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ értékre állítottuk be. A tenyésztést 1 liter űrtartalmú üvegballonokban végeztük. A szuszpenzió túlzott mértékű felmelegedését ventillátorok alkalmazásával gátoltuk meg. A tenyészet hőmérsékletét 29 °C-on stabilizáltuk. A sejteket növekedésük késői logaritmikus fázisában 8000 g gyorsulással 10 percig centrifugáltuk, majd többszöri Tris-pufferrel történő átmosás és újbóli centrifugálás után további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.2. Kromatofora izolálása

A 80-100 g lefagyasztott sejtet kiolvadás után Tris-pufferrel többször átmostuk, majd 400 ml-re hígítottuk. Ezután a sejteket ultrahang készülék (Bandelin HD2200, 200 W, 20 kHz és Bandelin TT 13 titán fej) segítségével feltörtük. Az egy másodperces ciklusok alatt fél másodperces aktív időtartamot használtunk. A feltöréshez használt teljesítmény a szonikátor maximális teljesítményének 90 %-a volt. A tartóedényt jéggel vettük körül a 60 perces ultrahangos kezelés alatt, hogy a keletkező hőt elvezessük. A kezelés során proteázgátlót alkalmaztunk. Az EDTA (10 mM, pH = 8,0) a jelenlévő fémionokkal kelátot képez, jelentősen lecsökkenti azoknak a proteázoknak az aktivitását, melyek működéséhez bivalens kationok szükségesek. A feltöretlen sejteket és a sejtfal darabjait centrifugálással (20000 g, 15 perc, 4 °C) ülepítettük le. A felülúszóból a kromatoforákat ultracentrifugálással (240000 g, 120 perc, 4 °C) nyertük ki. Az üledéket minimális Tris-pufferrel felszuszpendáltuk, elkerülve a szürke központi magot, amely főleg sejtfaltörmeléket és szervetlen szennyezéseket tartalmazott. Ilyen állapotban a kromatofora későbbi felhasználás céljaira befagyasztva tárolható.

4.3. A reakciócentrum izolálása és tisztítása

A fentiek szerint preparált kromatofora optikai denzitását 860-nm-nél mérve, 1 cm-es küvettában, Tris-pufferrel hígítva 50-re állítottuk be. Szobahőmérsékleten, gyenge megvilágítás és állandó keverés mellett, 30 %-os LDAO (laurildimetilamin-N-oxid) ionikus detergenst csepegtettünk a kromatofora szuszpenzióhoz, míg az LDAO koncentráció elérte a 0,45 %-ot. 30 perces sötétben történő keverést követően az oldhatatlan sejtalkotókat ismételt ultracentrifugálással ülepítettük le (240000 g, 90 perc, 4 °C). A RC-ok mintegy 90 %-a a felülúszóban halmozódott fel. A feltárás hatékonyságát optikai úton ellenőrizhettük a monomer bakterioklorofill 802 nm-es csúcsánál ($\epsilon = 288\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, [111]). Amennyiben a preparálás hatásfokát nem találtuk kielégítőnek, úgy az LDAO-val történő kezelést és az ultracentrifugálást megismételtük.

A *Rhodobacter sphaeroides*-ből izolált RC-ot több lépésből álló ammónium-szulfátos ($(NH_4)_2SO_4$) precipitálással tisztítottuk. Az LDAO koncentrációját 1 %-ra emeltük, mert

így a kicsapódó pellet stabilabbnak bizonyult. Első lépésben az oldat pH-jának állandó értéken tartása mellett (pH = 8,0) fokozatosan szilárd ammónium-szulfátot adtunk a RC-hoz (0,27 g/ml), majd 8000 g gyorsulással 15 percig centrifugáltuk. A pelletet az LDAO koncentráció csökkentése érdekében LDAO nélküli pufferben (Tris) felszuszpendáltuk, majd egyenlő térfogatú AS pufferben (0,5 g/ml $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM Tris, 0,03 % LDAO, pH = 8,0) ismételten kicsaptuk. Centrifugálás után (8000 g, 10 perc) a RC ismét a felülúszóban található, amelyet TL-pufferben (10 mM Tris, 0,03 % LDAO, 1 mM EDTA, pH = 8,0) szuszpendáltuk fel. Ezt követően a sókoncentrációt alacsonyabbra állítottuk be (0,12 g/ml $(NH_4)_2SO_4$), így a RC oldatban maradt és különböző szürkészöld fehérjék csapódtak ki, amelyeket ismételt, az előző lépéssel megegyező paraméterű centrifugálással választottunk el. A RC tisztaságát az egyes tisztítási fázisok után az abszorpciós spektrum két jellemző sávjának (280 és 800 nm) extinkció arányából határoztuk meg. A 280 nm-re centrált sáv az aromás aminosavakra (Trp, Tyr, Phe) jellemző, amelyek száma a RC szerkezetéből ismert. Az abszorpciós együtthatók felhasználásával meghatározható, hogy a tiszta fehérje esetében mekkora lehet ennek a csúcsnak az intenzitása a 800 nm-nél abszorbeáló monomerikus bakterioklorofill mennyiségéhez viszonyítva, amelyből 2 van a RC-ban (Bkl_A és Bkl_B). A fenti arány tökéletesen tiszta preparátum esetén 1,2 körül van [23, 24]. Meg kell említeni, hogy ezek az értékek a másodlagos kinon aktivitásának helyreállítása nélkül (a preparálás során a Q_B-nak mintegy 50 %-a elvész) mérhető arányok, hiszen a kinonoknak is van 280 nm körül abszorpciós sávjuk, amely ezt a viszonyszámot körülbelül 1,26-ra emeli.

A tisztaságon kívül a másik lényeges preparálási paraméter a már említett másodlagos kinon aktivitás (kinonkötő képesség). Ezt a sztöchiometrikus mennyiség 10-20-szoros értékének hozzáadásával tudtuk 90-95 %-os valószínűséggel visszaállítani. Ennek egyik ellenőrzése lehet az egyetlen telítési fényfelvillanást követő töltésrekombináció analízise (lásd Fényindukált abszorpcióváltozás kinetikai mérése fejezetet), ahol a lassú komponensnek a teljes jel nagyságához viszonyított aránya jellemzi a másodlagos kinon aktivitást [81].

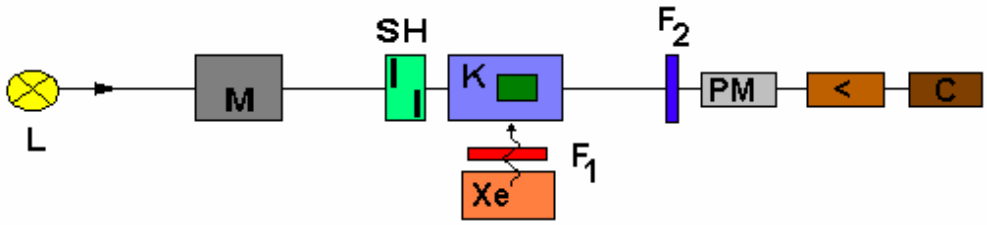
Az ammónium-szulfátos kicsapást követően a RC tisztaságát jellemző érték általában túl magas, 2 körüli. A RC-t anioncserélő kromatográfiával tovább tisztítottuk. Ezt megelőzően a minta sókoncentrációjának csökkentése érdekében 12 órás dialízist (Visking 5/32 dializáló membrán, Serva) alkalmaztunk, dializáló fürdőben (TL-puffer + 20 μM EDTA-ban, 4 °C-on). Ezzel párhuzamosan előkészítettük a kromatográfiához szükséges oszlopanyagot (DEAE Sephacel, Sigma): 1 M-os NaCl oldattal aktiváltuk, majd körülbelül 2 liter oszlopmosó pufferrel (10 mM Tris, 0,1 % LDAO, 20 μM EDTA, pH = 8,0) átmostuk. A mosási folyamatot addig végeztük, amíg az oszlopról lecsöpögő oldat pH-ja meg nem egyezett az oszlopmosó puffer pH-val. Ez határozta meg a felvitt puffer pontos térfogatát is. Ezt követően a dializált és hígított RC-ot felrétegeztük az oszlopra, és a szennyeződéseket (elsősorban antenna maradványokat) 60 mM NaCl-ot tartalmazó oszlopmosó pufferrel az oszlop térfogatának többszörös mennyiségével kimostuk. Eközben a RC is lassan haladt az oszlopon lefelé. Az oszlop hosszának helyes megválasztásával elérhető, hogy a szennyeződések eltávolítása után a RC az oszlop alsó harmadába kerüljön. A fő sávot 150 mM NaCl tartalmú oszlopmosó pufferrel távolítottuk el az oszlopról, mintegy 20, egyenként 5 ml térfogatú frakciókat gyűjtve. Az egyes frakciók tisztaságát a korábban már említett abszorpciós sávok arányából határoztuk meg. *Rhodobacter sphaeroides*-ből izolált RC-oknál az 1,2 -1,6 közötti tisztaságú preparátumokat tekintettük további felhasználásra alkalmasnak. Az oszlopon maradt erősen szennyezett RC-kat 400 mM sókoncentrációval távolítottuk el.

A tiszta frakciókat összegyűjtöttük, ultraszűréssel (Whatman 100 membrán, 0,16-0,2 MPa) 50 μM-os koncentrációra töményítettük, majd 2 UQ10/RC mennyiségű ubikinon-10 hozzáadásával helyreállítottuk a másodlagos kinon aktivitását. A helyreállításra azért volt

szükség, mert a RC másodlagos kinon kötőhelye üres (betöltetlen) állapotban, még 4 °C-on tartva is igen gyorsan roncsolódik. A magas sókoncentrációt és a detergens mennyiségét dialízis (10 mM Tris, 0,03 %LDAO, 20 μM EDTA, pH = 8,0) segítségével csökkentettük. A mérések során alacsony pH-n (ph $\sim$ 5) az LDAO jelenléte zavaró mert protonálható csoportja van. A preparálás során ellenben más detergens használata csökkentené annak hatásfokát, ezért végső lépésként célszerű az LDAO-t más detergensre (pl. Triton X-100, Serva) kicserélni. A cserét 24 órás dialízissel végezhetjük a dializáló fürdő (0,03 % Triton X-100, 10 mM NaCl, pH = 8,0) gyakori cseréje mellett. Ezt követően a RC-okat körülölelő LDAO micellák 95 %-ban kicserélődnek az új detergens micelláira.

4.4. Fényindukált abszorpcióváltozás kinetikai mérése

A fotoszintetikus RC-ok és kromatoforák fényindukált abszorpcióváltozását házilag készített egysugaras kinetikai fotométerrel vizsgáltuk [69] (4.1 ábra). A kromatoforák vizsgálatainál a membrán két oldala közötti töltéskülönbség kiegyenlítése érdekében 6 μM valinomycint (kálium szelektív ionofort) adtunk a reakcióelegyhez. A membránban jelenlévő karotinoidok abszorpciója a töltéskülönbség miatt eltolódna, ami zavarná a kiértékelést.



4.1 ábra. Egysugaras kinetikai fotométer blokksémája. Jelölések: L - mérőfényt szolgáltató fényforrás, M - monokromátor, SH - fényzár, K - küvettatartó, Xe - villanólámpa, hullámos nyíl - gerjesztő fényfelvillanás, F_1 és F_2 - kék és vörös optikai szűrők, PM - fotoelektron-sokszorozó, $<$ - elektronikus előerősítő, C - jelfeldolgozó számítógép (A/D konverter kártyát tartalmaz).

A nem gerjesztő intenzitású mérőfényt egy stabilizált egyenáramú tápegységből táplált 50 W-os, 12 V-os halogén autóizzó szolgáltatta. Az izzólámpa fényét kondenzor lencse segítségével a monokromátor (Zeiss (Jena) SPM 2) belépő résére fókuszáltuk, míg a kilépő rést a mintatartóban elhelyezett küvettán keresztül a fotoelektron-sokszorozó (Hamamatsu R-928, oldalablakos) fotokatódjára képeztük le. Az optikai gerjesztés Xe villanólámpával (EG&G FX200, félélettartama 8.5 μs) 1 kV töltőfeszültség, és 4 μF kapacitású kondenzátor használatával történt. A villanólámpa fényét 1 cm átmérőjű fényvezető plexirúd segítségével vezettük a mintát tartalmazó 1 cm $\times$ 1 cm-es küvetta oldalához, hogy a telítési gerjesztést biztosítsuk. A fotoelektron-sokszorozót 430 nm-nél történt mérések esetében keresztezett optikai szűrők védték: A Xe villanólámpa fényét 750 nm felett átengedő szűrőn (Kodak zselatinszűrő) vezettük keresztül a mintára (a megmaradó vörös sáv elegendő volt a telítési gerjesztéshez), míg a fotokatód elé széles sávú kék szűrőt (Corning 4-96) helyeztünk el. A 605 nm-nél történt mérések esetében hasonlóak voltak az optikai körülmények, ellenben a fotokatódhoz a fényt egy második monokromátoron (Jobi-Yvon H20 VIS) keresztül vezettük. A fotoelektron-sokszorozó DC-szintjét 100 mV-ra állítottuk be, amit a mérőfény hatására a változtatható munkaellenálláson (10-100 kΩ) fellépő feszültséggel a fényfelvillanás előtt kiegyenlítettük. A detektor jelét egy Advantech PCL818 analóg/digitális átalakító közbeiktatásával egy IBM PC/386 AT típusú számítógéppel dolgoztuk fel.

4.5. Az abszorpcióváltozások kiértékelése

Izolált RC minták esetében másodlagos elektron donor (citokróm) hiányában egyetlen telítési fényfelvillanást követően a 430 nm-nél megfigyelhető gyors abszopcióváltozás az elsődleges donor oxidációját jelzi, amelyet lassabb, összetett kinetikával leírható lecsengés követ [63, 84, 112, 113]. A kinetika két jól elkülöníthető komponenssel jellemezhető, amely a natív, másodlagos kinon aktivitással rendelkező RC-okban abból származik, hogy a Q_B kötőhelyek betöltöttsége nem teljes. Így a RC-ok populációja heterogén. Léteznek csak Q_A-t tartalmazó RC-k is, melyek töltésrekombinációja mintegy 10-szer gyorsabb ($k_{AP} = 10\ s^{-1}$; pH = 8,0; R-26 vadtípus), mint a Q_B aktív RC esetén megfigyelhető érték ($k_{BP} = 1\ s^{-1}$; pH = 8,0; R-26 vadtípus). A stabilizált töltéspárok ($P^+Q_A^-$ és $P^+Q_B^-$) rekombinációja elsőrendű folyamatként kezelhető, így exponenciális függvénnyel írható le. Mivel a töltésrekombináció összetett is lehet ezért a kinetika, több exponenciális lineáris kombinációjaként kezelhető:

$$[P^+](t) = \sum_{i=1}^{n} A_i \cdot e^{(-k_i \cdot t)}, \tag{4.1}$$

ahol $[P^+](t)$ az oxidált dimér koncentrációja a t-edik időpillanatban, A_i az amplitúdója, k_i pedig az i-edik komponens sebességi állandója. A görbeillesztést a Marquardt-Levenberg-féle nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével [114] végeztük, mely implementálva van a GNUPlot 4.0 multiplatform nyíltforráskódú ábrázoló és illesztő alkalmazásban (`http://www.gnuplot.org`).

Az abszorpcióváltozás amplitúdójából meghatároztuk a fotoaktív RC-ok koncentrációját a Beer-Lambert törvény alapján ($\epsilon(430\ nm) = 26\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$).

A kromatofora minták fotoaktív RC-koncentrációját a P^+ primér donor 860 nm feletti telítési gerjesztését követő, 605 nm-nél mért abszorpcióváltozásából határoztuk meg. 605 nm-nél a P és P^+ formák extinkciós koefficienseinek különbségét 20 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$-nak vettük [115].

4.6. A késleltetett fluoreszcencia keletkezése

4.6.1. Szabad pigment fluoreszcenciája

A fehérje szingulett alapállapotú P pigmentje fénygerjesztést követően az első gerjesztett szingulett állapotba (P^*) kerül, ahonnan fluoreszcencia fényt (fotont) kibocsátva jut vissza alapállapotba. A fluoreszcencia fénynek tetszés szerinti t időpillanatbeli intenzitása ($F(t)$), a gerjesztett állapotú pigmentek koncentrációjának ($[P^*](t)$), és a sugárzásos átmenet sebességállandójának (k_f) a szorzata:

$$F(t) = k_f \cdot [P^*](t) \tag{4.2}$$

Ezzel a folyamattal párhuzamosan (vele versenyezve) olyan (sugárzásmentes) átmenet is létrejön, amely nem jár foton emissziójával. Ennél az átmenetnél (amelynek sebességi állandója k_{nr}) a pigment gerjesztési energiája a rezgési energiaszintek rendszerén keresztül fokozatosan, hő formájában adódik át a környezetének. Mivel a két folyamat egymástól függetlenül és párhuzamosan megy végbe, a gerjesztett állapot lecsengésének eredő (megfigyelt) sebességi állandója (k_p) a két részfolyamat sebességi állandóinak összege:

$$k_P = k_f + k_{nr} \tag{4.3}$$

Pillanatszerű és telítési gerjesztést követően a gerjesztett pigment koncentrációjának időbeli változását a

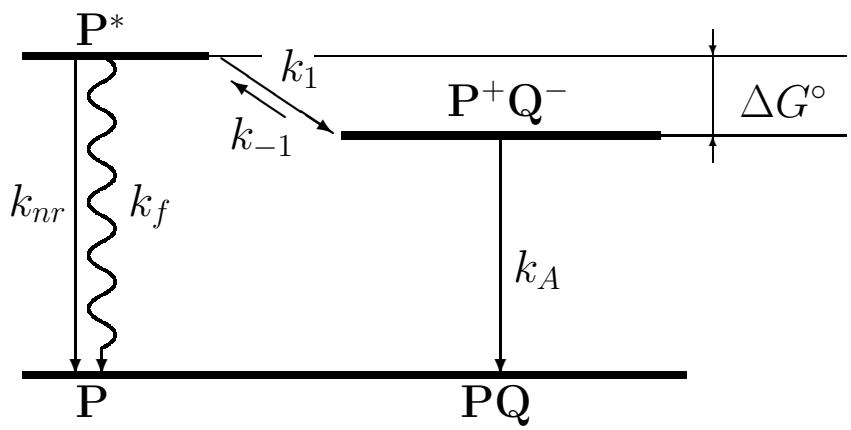
$$\frac{d[P^*]}{dt} = -k_P \cdot [P^*] \tag{4.4}$$

elsőrendű lineáris differenciálegyenlet írja le, amelynek megoldása

$$[P^*](t) = e^{(-k_P \cdot t)}, \tag{4.5}$$

ha a $t = 0$ időpillanatban a gerjesztett állapotú pigmentek koncentrációját egységnyinek választjuk. A (4.2) egyenletet figyelembe véve a megfigyelt fluoreszcencia lecsengése monoexponenciális, a sebességi állandója a sugárzásos és nemsugárzásos átmenetek sebességi állandóinak összege (lásd a (4.3) egyenletet), és a fluoreszcencia kvantumhatásfoka

$$\eta_0 = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \tag{4.6}$$



4.2 ábra Egyszerű modell a prompt és a késleltetett fluoreszcencia lecsengések szétválasztására két tranziens állapottal (P^* és P^+Q^-) rendelkező rendszerben pillanatszerű gerjesztést követően [116] alapján. P a gerjeszthető pigmentet, Q az elektron akceptort, P^+Q^- a töltésszétválasztott állapotot, és k a sebességállandókat jelöli. Az állapotoknak megfelelő szinteknek az egymástól vett távolsága a standard szabadenergia-különbségeknek (ΔG°) feleltethető meg.

4.6.2. Fotokémiai folyamathoz kötött pigment fluoreszcenciája

Gyakori, hogy a biomolekula pigmentje valamilyen (foto)fizikai/kémiai folyamathoz csatolt, amelynek révén a gerjesztett állapotú pigment a gerjesztési energiáját ezzel a folyamattal is elveszítheti (versenyben az előbb említett sugárzásos és nemsugárzásos átmenetekkel). Ez az átmenet tehát csapda a gerjesztési energia számára, amelyből vagy egyáltalán nincs kiút (irreverzibilis a folyamat), vagy csak részleges visszatérés lehetséges (reverzibilis a folyamat). Ilyen mechanizmusra példa a triplett-képződés, vagy a töltésszétválasztás a fotoszintetikus RC-fehérje esetében.

Irreverzibilis folyamat

Ezen átmenet révén P* lecsengése egy újabb, k_1 sebességi állandóval jellemzett folyamattal bővül (4.2 ábra) anélkül, hogy az elcsatolt gerjesztési energiából bármilyen kicsiny hányada vissza tudna kerülni ($k_{-1} = 0$). A szabad pigmentre megadott kifejezéseket ennek megfelelően ki kell bővítenünk. Pillanatszerű gerjesztést követően a gerjesztett pigment koncentrációjának időbeli változása

$$[P^*](t) = e^{-(k_p+k_1)\cdot t} \tag{4.7}$$

azaz a megfigyelt fluoreszcencia lecsengése továbbra is monoexponenciális marad, csupán felgyorsul és a hatásfoka

$$\eta_{\text{prompt}} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr} + k_1} \tag{4.8}$$

kisebb lesz ($\eta_{\text{prompt}} < \eta_0$).

Reverzibilis folyamat

Lényegesen módosul a fluoreszcencia lecsengése, ha az elcsatolt gerjesztési energia egy része (k_{-1} sebességi állandóval jellemzett visszreakció, 4.2 ábra) visszakerülhet a szabadenergiát átmenetileg tároló (töltésszeparált P^+Q^-) állapotból a pigmentre. Ezen két átmeneti állapotú rendszer időbeli változására pillanatszerű gerjesztést követően az alábbi csatolt differenciálegyenletek (mérlegegyenletek) írhatók fel:

$$\frac{d[P^*]}{dt} = -(k_p + k_1) \cdot [P^*] + k_{-1} \cdot [P^+Q^-] \tag{4.9}$$

$$\frac{d[P^+Q^-]}{dt} = k_1 \cdot [P^*] - (k_A + k_{-1}) \cdot [P^+Q^-] \tag{4.10}$$

ahol k_A annak a folyamatnak a sebességi állandóját jelöli, amellyel a P^+Q^- akceptor állapot a töltések rekombinációjával a PQ alapállapotba kerül (4.2 ábra). Ha a (4.9) és (4.10) egyenletekből a $[P^+Q^-]$ változót eliminájuk, akkor a gerjesztett állapotú pigment koncentrációjának időbeli változására a következő másodrendű differenciálegyenletet nyerjük:

$$\frac{d^2[P^*]}{dt^2} + (k_P + k_A + k_1 + k_{-1}) \cdot \frac{d[P^*]}{dt} + (k_1 k_A + k_A k_P + k_{-1} k_P) \cdot [P^*] = 0 \tag{4.11}$$

4.6.3. A fluoreszcencia lecsengésének sebességi állandói

A lehetséges sebességi állandókat a (4.11) egyenletből származtatható karakterisztikus egyenlet megoldásai adják. Mivel a karakterisztikus egyenlet másodfokú, így két (nem szükségképp egybeeső) gyököt fogunk kapni. Amennyiben feltételezzük, hogy k_1 sokkal nagyobb, mint a reakciósémában előforduló bármelyik sebességi állandó, akkor a (4.11) egyenlet karakterisztikus egyenletének két megoldása az alábbi alakra egyszerűsödik:

$$\lambda_1 = k_1 + k_{-1} + k_P \tag{4.12}$$

$$\lambda_2 = k_A + k_P \cdot \frac{k_{-1}}{k_1} \tag{4.13}$$

A reverzibilis (részleges visszatöltés) megengedése tehát a megfigyelt fluoreszcencia lecsengését kétfázisúvá (biexponenciálissá) tette. A gyorsabb komponens a gerjesztett állapot (kinetikai) egyensúlya kialakulásának sebességállandóját fejezi ki (ebben meghatározó az előreirányuló reakció sebességi állandója), a lassúbb komponens pedig a tranziens szabadenergia-tároló állapot kiürülési sebességi állandóját tükrözi. A gyors komponenst **prompt** (azonnali) fluoreszcenciának, a lassúbbat **késleltetett** fluoreszcenciának hívjuk [13].

4.6.4. A prompt és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdó-viszonyai

A gerjesztett állapotú pigment koncentrációjának időfüggése a (4.11) egyenlet megoldásával általánosan a

$$[P^*](t) = A_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \tag{4.14}$$

alakba írható fel, ahol A_1 és A_2 a gyors és lassú komponensek amplitúdóit jelölik. Meghatározásuk a kezdeti feltételekből történik: a $t = 0$ időpillanatban valamennyi pigment gerjesztett állapotban van ($[\mathrm{P}^*] = 1$), és a tranziens $\mathrm{P}^+\mathrm{Q}^-$ állapot üres ($[\mathrm{P}^+\mathrm{Q}^-] = 0$):

$$A_1 + A_2 = 1, \tag{4.15}$$

$$\lambda_1 \cdot A_1 + \lambda_2 \cdot A_2 = k_1 + k_P \tag{4.16}$$

A (4.15) egyenlet a (4.14) egyenletből, míg a (4.16) egyenlet a (4.9) egyenletből adódott a kezdeti feltételek behelyettesítése után. Felhasználva a sajátértékeknek a (4.12) és a (4.13) egyenletekkel megadott kifejezéseit,

$$A_1 = 1 - \frac{k_{-1}}{k_1} \tag{4.17}$$

és

$$A_2 = \frac{k_{-1}}{k_1} \tag{4.18}$$

adódik. Ha bevezetjük a P^* gerjesztett állapotot, és a $\mathrm{P}^+\mathrm{Q}^-$ tranziens töltéstároló állapot közötti standard szabadenergia-különbséget (ΔG°, 4.2 ábra), akkor (egyensúly esetén) ezzel a mennyiséggel egyszerűen kifejezhetjük a vissza- és az előreirányuló reakciók sebességállandóinak arányát:

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = exp \cdot -(\frac{\Delta G^\circ}{k_B T}), \tag{4.19}$$

ahol k_B a Boltzmann-állandót, és T az abszolút hőmérsékletet jelenti. Szobahőmérsékleten $k_B T \cong 25$ meV. Mivel a gyakorlatban előforduló esetek döntő többségében $k_{-1} \ll k_1$ (azaz $\Delta G^\circ \gg 25$ meV), ezért a gyors komponens (prompt fluoreszcencia) amplitúdója mindvégig egységnyinek vehető, a lassú komponens (késleltetett fluoreszcencia) amplitúdója pedig a Boltzmann-eloszlás szerint módosul, miközben a $\mathrm{P}^+\mathrm{Q}^-$ állapot szabadenergia-szintje változik a gerjesztett pigment szabadenergia-szintjéhez képest. A késleltetett fluoreszcencia

amplitúdójában megfigyelhető 1 nagyságrendű emelkedés (csökkenés) a P^* és a P^+Q^- állapot közötti 58 meV szabadenergia-különbség csökkenésének (emelkedésének) felel meg. A késleltetett fluoreszcencia amplitúdója érzékeny jelzője a P^+Q^- állapotnak, és a P^* állapothoz képest mért szabadenergia-szintjének.

4.6.5. A prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitás-viszonyai

A késleltetett fluoreszcencia amplitúdó-változásaiból a P^+Q^- állapot szabadenergia-szintjének relatív változásaira következtethetünk. A szabadenergiának a P^* szinthez képest mért (abszolút) értékét is meghatározhatjuk azonban, ha arányba állítjuk a prompt és a késleltetett fluoreszcencia teljes intenzitását (az emittált fotonok teljes számát, hatásfokát):

$$\frac{I_{\text{prompt}}}{I_{\text{késl}}} = \frac{A_1}{A_2} \cdot \frac{\lambda_2}{\lambda_1} \tag{4.20}$$

Ha beírjuk az amplitúdókat a (4.17) és a (4.18) egyenletek szerint, és a sebességállandóknak a (4.12) és a (4.13) egyenletek alatti kifejezéseit, k_1-t továbbra is lényegesen nagyobbnak tételezzük fel, figyelembe véve a (4.19) egyenletet, és az ebben a közelítésben is érvényes (4.8) egyenlet alapján k_1 helyébe k_f/η_{prompt}-ot írva kapjuk a következőt:

$$\frac{I_{\text{prompt}}}{I_{\text{késl}}} = \frac{k_A \cdot \eta_{\text{prompt}}}{k_f} \cdot exp \cdot (\frac{\Delta G^\circ}{k_{\text{B}}T}). \tag{4.21}$$

Ezen összefüggés alapján a prompt és a késleltetett fluoreszcencia (integrált) intenzitásai arányának méréséből a P^* és a P^+Q^- állapotok közötti szabadenergia-különbség meghatározható [14].

Érdemes megjegyezni, hogy a szabadenergia-különbséget sokkal kedvezőbb a prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak arányából meghatározni, mint az amplitúdó arányaiból, mivel a prompt és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdóinak aránya rendkívül nagy szám lehet ($\exp(\frac{\Delta G^\circ}{k_B T})$) és meghatározásuk (különösen a prompt fluoreszcencia esetén) rendkívül jó időfelbontást igényel. Ezzel szemben az (integrált) intenzitások viszonya a $(k_A \cdot \eta_{\text{prompt}})/k_f$ szorzófaktor miatt lényegesen mérséklődik, és az időfelbontás sem kritikus (lehet integrálni).

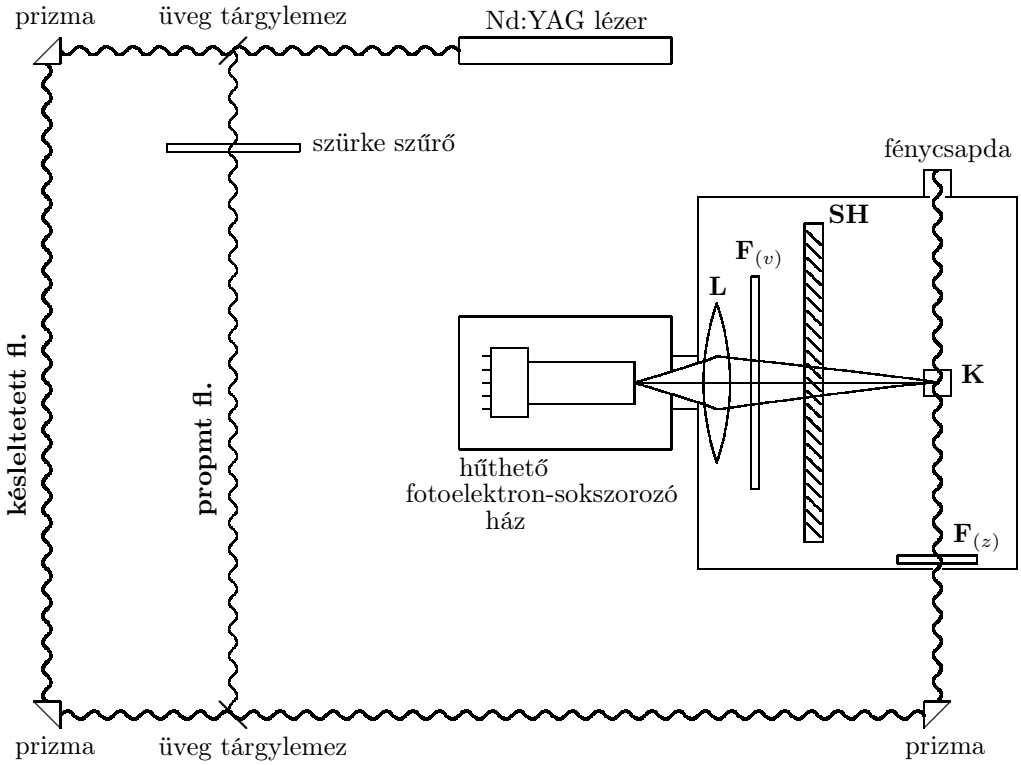
Bakteriális RC-fehérje esetében, $\Delta G^\circ \approx -900$ meV [14, 117], $k_A = 10s^{-1}$ [14, 118], $k_f \approx 8 \cdot 10^7 s^{-1}$ (a Strickler-Berg összefüggés alapján számolva [119]) [14] és $\eta_{\text{prompt}} = 4,0 \pm 1,5 \cdot 10^{-4}$ [102]. Ebben az esetben a késleltetett fluoreszcencia amplitúdója $2,3 \cdot 10^{-16}$-szorosa a prompt fluoreszcencia amplitúdójának, de az (integrált) intenzitása már "csak" $7,0 \cdot 10^{-6}$-szorosa a prompt fluoreszcencia intenzitásának.

4.7. A prompt és a késleltetett fluoreszcencia mérése

A fotoszintetizáló baktériumokból izolált RC-fehérje késleltetett fluoreszcenciáját egyrészt a rendkívül kicsiny hatásfok ($\eta \approx 10^{-14} - 10^{-15}$), másrészt a közeli infravörös detektálás (920 nm), harmadrészt a gerjesztés alatt a minta által kibocsátott erős prompt fluoreszcencia elválasztása miatt különösen nehéz mérni [14].

A RC-fehérjét tartalmazó minta pillanatszerű és telítési gerjesztését Q-kapcsolt Nd:YAG lézer frekvencia-kétszerezett fényimpulzusával (Quantel YG 781-10) értük el: a gerjesztő lézerimpulzus hullámhossza 532 nm, időtartama 5 ns és energiája 100 mJ. A lézer fényét néhány méter hosszú út után vezettük be a zöld sáváteresztő üvegszűrővel (Schott BG-18) lezárt és nagyon gondosan sötétített dobozba, hogy a térszög csökkentésével minimalizáljuk

a lézer villanólámpáinak szórt fénye által gerjesztett prompt fluoreszcenciát. A gerjesztő lézerfény a mintán való áthaladás után egy fénycsapdába kerül, és elnyelődik. Mindezzel minimumra csökkentettük a külső háttérfénynek a dobozba kerülését, az intenzív lézerfénynek a falakon való reflexióját, és az azáltal gerjesztett foszforeszcenciát. A RC-fehérje tartalmú mintát egy 1 cm × 1cm méretű, alacsony fluoreszcenciájú kvarcküvettába (Thermal Syndicate Ltd., "far UV") helyeztük, hőmérsékletét termosztálható küvettatartóval állítottuk be, és K-típusú (NiCr-Ni) termoelemmel (Vermer VE 305K) ellenőriztük.



4.3 ábra. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia méréséhez használt optikai mérőberendezés blokksémája. Jelölések: L - bikonvex optikai lencse, SH - mechanikus fényzár, K - kvarc küvetta, $F_{(v)}$ - vörös felüláteresztő szűrő, $F_{(z)}$ - zöld sáváteresztő szűrő. Részletesebb leírást lásd a szövegben.

A prompt és a késleltetett fluoreszcenciát a gerjesztő lézerfényre merőlegesen detektáltuk. A mintából származó fluoreszcenciafényt vörös felüláteresztő szűrőn (Schott RG-850) át bikonvex lencse képezte le az infravörösérzékeny és végablakos -30 ° C–ra hűtött (Photocool PC 410CE, Products for Reaserch Inc.) fotoelektron-sokszorozó (Hamamatsu R 3310-03) fotokatódjára. Egy a fotoelektron-sokszorozó és a minta közé elhelyezett elektromos úton vezérelhető mechanikus fényzár (Uniblitz VS25) védte a fotokatódot a rendkívül intenzív prompt fluoreszcencia fénytől: a gerjesztés ideje alatt zárt állapotban volt, majd a lézer frekvenciaosztó elektronikájával összehangolt, házilag készített jelgenerátor indító jelére kinyitott (nyitási idő kevesebb, mint 10 ms), és szabaddá tette az optikai utat a fotoelektron-sokszorozóhoz. A szórt lézerfény által az optikai elemekből kiváltott foszforeszcencia minimalizálása céljából az emissziós szűrőt és a lencsét a fényzár mögé helyeztük, így a szórt lézerfény nem gerjeszthette azokat.

A jel/zaj viszonyt a mérések ismétlésével, és az egyedi kinetikák összeadásával lehet növelni. Izolált RC minták esetében 256, míg izolált kromatofora minták esetében 128 jel átlagolása már kielégítő jel/zaj viszonyt eredményezett. A fotoelektron-sokszorozó jeleit egy digitális oszcilloszkóp (Tektronix TDS 3032) segítségével gyűjtöttük, és átlagoltuk, majd a kapott kinetikák kiértékelése számítógépen történt. A késleltetett fluoreszcencia lecsengése (hasonlóan a töltésrekombináció kinetikákhoz) több exponenciális komponens lineáris kombinációjaként kezelhető. A görbeillesztéseket szintén a már korábban említett GNUPlot alkalmazás segítségével végeztük.

A RC-fehérje bakterioklorofill dimérje által kibocsátott prompt fluoreszcencia integrált intenzitását ugyanolyan optikai és elektronikai (erősítés és szűrés) körülmények között mértük, mint a késleltetett fluoreszcencia esetében, ellenben a gerjesztő lézerimpulzus energiáját szürke-szűrő sorozat segítségével lecsökkentettük. A prompt fluoreszcencia mérésekor az elektromosan vezérelhető fényzár természetesen nyitott állapotban volt.

4.8. A P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbség kísérleti meghatározása

Izolált RC esetében, amennyiben gátlószer segítségével blokkoljuk a másodlagos kinon kötőhelyet, a RC által kibocsátott késleltetett és prompt fluoreszcencia integrált intenzitás viszonyai alapján meg tudjuk határozni a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbséget. Felhasználva Arata és mtsai. által megadott összefüggést [14], valamint, ha az integrált intenzitásokat a késleltetett és a prompt fluoreszcencia lecsengésének illesztése során kapott élettartam és amplitúdó értékek szorzatával közelítjük, a következő kifejezést kapjuk:

$$\Delta G_{P^*A} = k_B T \cdot ln(\frac{\phi_f}{k_f \cdot \phi_p} \cdot \frac{A_{\mathrm{kf}} \cdot \tau_{\mathrm{kf}}}{A_p \cdot \tau_p} \cdot t_{\mathrm{szűrő}}), \tag{4.22}$$

ahol ΔG_{P^*A} a két állapot közötti szabadenergia-különbséget, k_B a Boltzmann-állandót, T a hőmérsékletet, ϕ_f a gerjesztett dimér prompt fluoreszcenciájának hatásfokát RC-ban (4,0 $\pm$ 1,5 $\cdot$ 10^{-4}), k_f a bakterioklorofill sugárzási sebességi állandóját ($8 \cdot 10^7 s^{-1}$, a Strickler-Berg összefüggés alapján), ϕ_p a töltésszétválasztás kvantumhatásfokát (0,98 $\pm$ 0,04), A az amplitúdót, τ az élettartamot, míg $t_{\mathrm{szűrő}}$ a prompt mérés során alkalmazott mikroszkóp tárgylemezek és szürke-szűrő (4.3 ábra) transzmisszióját jelöli.

4.9. Alkalmazott számítógép-szimulációs módszerek

4.9.1. Molekuladinamika

A makroszkopikus rendszerek tulajdonságait molekuláris szintű viselkedések határozzák meg. Kvantitatív és/vagy kvalitatív információkat nyerhetünk a makromolekulák makroszkopikus tulajdonságairól a rendszer atomi szintű szimulációjának segítségével. Biológiai makromolekuláknál a legegyszerűbben (a rendszer mérete miatt) a molekulamechanika (**MM**) segítségével tudjuk leírni rendszerünk felépítését. A MM-szintű kezelésnél a molekulák felépítését gömbök (atomok parciális atomi töltéssel), és az azokat összekötő rugók (atomok közötti kötések) segítségével modellezzük. Ilyen közelítésnél a molekularendszer energiáját egyszerű analitikus formában megadott függvények segítségével írhatjuk le. Ezek

az analitikus formában megadott függvények írják le a kötő és nemkötő kölcsönhatásokat a rendszert alkotó atomok között.

A potenciális energia analitikus formájának kifejezésére számos erőtér paraméter készletet fejlesztettek ki (például AMBER [120], CHARMM [121], GROMOS [122], OPLS-AA [123]). A potenciális energia kifejezését a következő tagokra lehet bontani:

$$V(\mathbf{r}(t)) = \underbrace{\sum_{\text{kötések}} k_i^{\text{kötés}}(r_i - r_0)^2}_{V_{\text{kötési}}} + \underbrace{\sum_{\text{szögek}} k_i^{\text{szög}}(\theta_i - \theta_0)^2}_{V_{\text{szög}}} ++ \underbrace{\sum_{\text{torziók}} k_i^{\text{torzió}}[1 + cos(n_i\phi_i + \delta_i)]}_{V_{\text{torziós}}} +$$

$$\underbrace{\sum_i \sum_{j \neq i} [(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^{12} - (\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^6] + \sum_i \sum_{i \neq j} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}}_{V_{\text{nemkötő}}}$$

$V_{\text{kötési}}$ = 2 atom egyensúlyi kötéstávolság menti rezgését leíró tag,
$V_{\text{szög}}$ = 3 atom által bezárt szög vibrációját leíró tag,
$V_{\text{torziós}}$ = 2-2 atom központi kötés körüli torziós mozgását leíró tag,
$V_{\text{nemkötő}}$ = nemkötő (van der Waals (Lenard-Jones potenciál) és elektrosztatikus) kölcsönhatásokat leíró tag.

Az erőtérkészletek segítségével a molekularendszer potenciális energiáját ki lehet számolni a rendszert alkotó összes atom helyének a függvényében. Emellett az összes atom által gyakorolt erő adott geometria esetében kifejezhető a potenciális energia hely szerinti negatív differenciál hányadosaként. Így egy adott részecskére ható erő Newton második törvényének felhasználásával a következő formában írható le:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V(\mathbf{r}(t))}{\partial \mathbf{r}_i} = m_i \mathbf{a}_i \tag{4.23}$$

Ez azt jelenti, hogy az m_i tömegű részecske a rá ható erő ($\mathbf{F}$) nagyságának és irányának megfelelő mértékben változtatja a helyét és a sebességét. A Newton-féle mozgásegyenlet idő szerinti numerikus integrálásának segítségével megmondhatjuk a rendszert alkotó összes részecske (atom) helyét bármely pillanatban.

A mozgásegyenlet időszerinti numerikus integrálását nevezzük molekuladinamikai (**MD**) szimulációnak. A legáltalánosabban használt idő szerinti integrációs algoritmus a mozgásegyenlet megoldására (a MD szimulációk során) a Verlet, vagy más néven bakugrás/békaugrás (leap-frog) algoritmus [124, 125]. Az az alapötlet, hogy az elmozdulás vektor $\mathbf{r}$(t) időbeni változását két harmadrendű Taylor-sor segítségével fejezzük ki (előre irányuló, illetve visszirányú időfejlődésnél).

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\Delta t^2 + \frac{1}{6}\mathbf{b}(t)\Delta t^3 + O(\Delta t^4)$$

$$\mathbf{r}(t - \Delta t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\Delta t^2 - \frac{1}{6}\mathbf{b}(t)\Delta t^3 + O(\Delta t^4)$$

Itt $\mathbf{r}$ az elmozdulást, $\mathbf{v}$ a sebességet, $\mathbf{a}$ a gyorsulást, és $\mathbf{b}$ az elmozdulás vektor időszerinti harmadik deriváltját jelenti. Összeadva a két kifejezést, ezt kapjuk:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2 \cdot \mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \mathbf{a}(t)\Delta t^2 + O(\Delta t^4) \tag{4.24}$$

Ez a Verlet-algoritmus alapkifejezése. Mivel mi a newtoni mozgásegyenletet integráljuk, ezért $\mathbf{a}$(t) felírható az erő és a tömeg hányadosaként, míg az erő megadható az elmozdulás $\mathbf{r}$(t) függvényeként:

$$\mathbf{a}(t) = -\frac{1}{m}\nabla V(\mathbf{r}(t)) \tag{4.25}$$

ahol V a potenciális energiát jelenti. Az alap Verlet-algoritmus egyik problémája, hogy a sebességeket nem kapjuk meg direkt módon. Noha az időfejlődés szempontjából nem fontos ismernünk a sebességeket, mégis néha szükségünk van rájuk. Ezen felül a sebességek szükségesek a kinetikus energia (K) meghatározásához, amire az energiamegmaradás tételének tesztelése során van szükségünk ($E = K + V$). Ez az egyik legfontosabb teszt arra, hogy megállapítsuk a MD szimuláció helyes lefolyását. Emiatt a Verlet-algoritmus számos továbbfejlesztése jelent meg, ahol már a sebesség implicit módon szerepel az algoritmus végső egyenleteiben.

Ily módon figyelemmel kísérhetjük egy rendszer időbeli fejlődését (adott periódus alatt) a MD szimuláció segítségével, ha ismerjük a rendszert alkotó összes atom kiindulási pozícióját, valamint sebességét. A kiindulási pozíciót általában a kristályszerkezeti adatok felhasználásával tudjuk megadni, vagy más optimalizációs eljárások adatait használhatjuk fel. A kiindulási sebességeket pedig a szimuláció hőmérsékletének megfelelő Maxwell-Boltzmann eloszlás alapján tudjuk véletlenszerűen generálni az atomokhoz.
Maga a MD szimuláció a következő lépésekből épül fel:

1. A molekulákat leíró fájlok elkészítése

   Ez például jelentheti különböző molekulák elhagyását, magát a topológiát leíró fájl elkészítését, az erőtérkészlet módosítását, valamint oldószer molekulák hozzáadását a rendszerhez.

2. Energiaminimalizáció

   T = 0 K-on relaxáljuk a rendszert.

3. Hevítés

   Fokozatosan emeljük a rendszer hőmérsékletét több lépésben, és közben megfelelő időt adunk a rendszer számára az egyensúlyi állapot elérésére.

4. Dinamikai szimuláció

   A szimuláció megfelelő kondíciók mellett (bizonyos paraméterek állandó értéken tartása: hőmérséklet, nyomás, térfogat, energia, és/vagy a résztvevő atomok száma).
   Közben a szükséges adatok begyűjtése.

5. Analízis

   A szimuláció során gyűjtött adatok kiértékelése. A rendszer jellemzésére használt állapotfüggvények meghatározása. A szerkezet időbeni változására vonatkozó adatok elemzése.

A MD szimulációkat felhasználhatjuk a molekulák strukturális felépítésének vizsgálatára. Ezenkívül mintázhatjuk a MD szimuláció során a molekula által felvett különböző konformációs állapotokat. Kellő hosszúságú szimuláció esetében a rendszerünk több időt

fog eltölteni alacsony energiájú konformációkban, mint magas energiájúban. Így a megvizsgált konformációkhoz tartozó energiák Boltzmann-eloszlást fognak követni. Az ergodikus közelítésnek megfelelően a különböző tulajdonságok időátlaga a termodinamikai sokaságátlaghoz fog közelíteni, és ezek az átlagértékek szükségesek a rendszer makroszkopikus tulajdonságainak meghatározásához.

A generált konformációk alapján meghatározott átlagos potenciális energiákat felhasználhatjuk a szabadenergia meghatározásához. Mi a MD szimulációkat a lineáris kölcsönhatási energiák módszerhez, valamint a szabadenergia perturbáció módszerhez használtuk fel.

4.9.2. Lineáris kölcsönhatási energiák módszere

Több módszer is létezik kis molekulák (ligandumok), és nagyméretű fehérjemolekulák közötti abszolút kötési szabadenergia meghatározására. Az egyik leggyorsabb eljárás ezek közül a lineáris kölcsönhatási energiák (Linear Interaction Energy, **LIE**) módszere [126]. A módszer lényege, hogy csak két fizikai állapotot vesz figyelembe: (1) a ligandum oldószerben (vizes fázis) van szabad állapotban, és (2) a ligandum fehérjéhez kötött állapotban van. Így feltehetjük, hogy az a szabadenergia-változás, ami a ligandumnak a vizes fázisból (szabad állapot) a vízmolekulákkal telített fehérjén belüli kötőhelyére (kötött állapot) történő mozgatáshoz kell, megegyezik a ligandum abszolút kötési szabadenergiájával:

$$\Delta G_{\text{kötési}}(\text{l}) = \Delta G^{\text{f}}_{\text{szolv}}(\text{l}) - \Delta G^{\text{v}}_{\text{szolv}}(\text{l}), \tag{4.26}$$

ahol a felső index "f" a fehérjét, míg a felső index "v" a vizet jelenti. $\Delta G^{i}_{\text{szolv}}(\text{l})$ a ligandumnak a "szolvatációs" szabadenergiáját jelenti a gázfázisból az adott környezetbe való mozgatása során. Egy ilyen folyamat legkevesebb két lépésre bontható: (1) egy molekuláris van der Waals "üreg" létrehozása az adott környezetben, és (2) az elektrosztatikus kölcsönhatás "bekapcsolása" a molekula és környezete között.

A $\Delta G_{\text{kötési}}$-t meghatározó formula számos átalakításon és közelítések alkalmazásán esett át. Most az általunk is alkalmazott alakot mutatjuk be:

$$\Delta G_{\text{kötési}} = \alpha \cdot \Delta\langle V^{vdw}_{l-k}\rangle + \beta \cdot \Delta\langle V^{el}_{l-k}\rangle \tag{4.27}$$

$\langle\rangle$ a nemkötő van der Waals (vdw) és az elektrosztatikus (el) kölcsönhatások átlagát jelenti a ligandum és a környezete között a szolvatált fehérje kötőhelyen (kötött), illetve a vizesfázisban (szabad) a MD szimuláció során. Δ a kötött és szabad állapotok esetében kapott átlagértékek különbségét jelenti. Az α és β paraméterek tapasztalati szorzófaktorok, melyeket számos ismert rendszer szimulációjának segítségével határoztak meg.

4.9.3. Szabadenergia perturbáció módszere

A fizikai kémia vitathatatlanul legfontosabb fogalma a szabadenergia. A szabadenergia leírja a különböző molekuláris rendszerek hajlandóságát az egymással való egyesülésre, valamint az egymással való reakcióba lépésre. Vegyünk két állapotot, A-t és B-t. Definiáljunk egy "utat" ("reakciókoordináta"), amely mentén az A állapotból a B állapotba visszük a rendszert. Ez nem feltétlenül felel meg valódi fizikai reakciókoordinátának (például két molekulát is transzformálhatunk egymásba). A két állapot közötti szabadenergia-különbséget ($\Delta G = G_B - G_A$) kifejezhetjük a két állapotot leíró H_A és H_B Hamilton-függvények segítségével:

$$G_B - G_A = \Delta G = -RTln\langle e^{-\frac{\Delta H}{RT}}\rangle_A \tag{4.28}$$

R az egyetemes gázállandót (R = 8,3145 $\frac{J}{mol \cdot K}$), T a hőmérsékletet, $\Delta H = H_B - H_A$, míg $\langle\rangle_A$ a H_A Hamilton-függvénnyel reprezentált állapot sokaság-átlagolását jelenti az A állapotban. A (4.28) egyenlet a szabadenergia perturbáció (Free Energy Perturbation, **FEP**) alap összefüggése [127]. Az összefüggés csak abban az esetben használható, ha az A (kiindulási) és a B (végső) állapot között csak kis mértékű változás (perturbáció) történik. A Hamilton-függvényt a következők szerint átalakítjuk:

$$H(\lambda) = \lambda H_B + (1 - \lambda)H_A \tag{4.29}$$

Itt bevezettük a λ csatolási paramétert, mely 0 ($H = H_A$) és 1 ($H = H_B$) közötti értéket vehet fel, és definiálja a "reakciókoordinátát", melynek mentén A-ból B-be jutunk. Ezt követően a Hamilton-függvény a λ csatolási paraméter függvénye is lesz egyben. A (4.29) kifejezést behelyettesítve a (4.28) egyenletbe kapjuk:

$$\Delta G = G_B - G_A = \sum_{\lambda=0}^{1} -RTln\langle e^{-\frac{\Delta H'}{RT}}\rangle_\lambda \tag{4.30}$$

$\Delta H' = H_{\lambda+d\lambda} - H_\lambda$-át jelenti. Ezzel az összefüggéssel a két állapot közötti szabadenergia-különbség meghatározását elegendően kicsiny intervallumokra osztjuk. Így egy-egy λ értéknél kellő pontossággal ki tudjuk számolni a szabadenergia értékét.

A *termodinamikai integrálás* egy alternatív út a két állapot közötti szabadenergia-különbség meghatározására. Itt szintén a kiindulási állapotot jellemezzük $H = H_A$, vagy (4.30)-nek megfelelően $\lambda = 0$-val, míg a végállapotot $H = H_B$-vel, illetve $\lambda = 1$-gyel. $H(\lambda)$-nak folytonosnak kell lenni a $\lambda = [0 - 1], [1 - 0]$ intervallumokban. Ekkor felírhatjuk a következő összefüggést:

$$\Delta G = \int_{\lambda=0}^{\lambda=1} \langle\frac{\partial H}{\partial \lambda}\rangle_\lambda d\lambda \tag{4.31}$$

A (4.31) alkalmazása esetén ki kell számolni a rendszert jellemző Hamilton-függvény λ szerinti differenciáljának a sokaság-átlagát a λ állapotban, különböző λ értékek esetében. Ezután valamilyen numerikus integrálási algoritmus alkalmazásával kapjuk meg a ΔG értékét (4.31)-at felhasználva.

A szabadenergia meghatározására a harmadik általánosan használt módszer az ún. "lassú fejlődés" (*slow growth*) módszere. Ebben az esetben a szimuláció során a Hamilton-függvényt infinitezimális mértékben változtatjuk lépésről-lépésre.

$$\Delta G = \sum_{\text{lépések száma},\lambda=0}^{\lambda=1} (H_{n+1} - H_n) \tag{4.32}$$

Itt H_n jelenti a Hamilton-függvényt adott λ értéknél, míg H_{n+1} jelenti a Hamilton-függvényt a következő nagyobb λ érték esetében. Ehhez az egyenlethez a (4.28) vagy a (4.31) kifejezések segítségével juthatunk el. A (4.28) kifejezésnél azt használjuk fel, hogy a ΔG értéke kicsi, míg a (4.31) kifejezésnél azt a közelítést, hogy $\frac{\partial H}{\partial \lambda} = \frac{\Delta H}{\Delta \lambda}$.

4.9.4. Automatikus dokkolás

Az automatikus dokkolás a ligandum és a makromolekula (fehérje) közötti kötési szabadenergia leggyorsabb meghatározási módja. A dokkolás során a "rigid" makromolekula és a flexibilis ligandum kötési konformációját próbáljuk megtalálni különböző illesztések segítségével, melyeket tapasztalati pontozó/értékelő függvény (*empirical scoring function*) segítségével rangsorolunk. Ezek az értékelő függvények MM erőtér paraméterkészleteken alapszanak és ennek segítségével határozzák meg a konformációs állapothoz tartozó energia értékét.

Tekintsük a következő termodinamikai ciklust:

$$\begin{tikzcd}
\mathbf{M}_v + \mathbf{L}_v \arrow[r, "\Delta G^v_{\text{kötési}}"] \arrow[d, "+\mathrm{H_2O}"', "\Delta G_{\text{szolv(M+L)}}"] & \mathbf{ML}_v \arrow[d, "+\mathrm{H_2O}"', "\Delta G_{\text{szolv(ML)}}"] \\
\mathbf{M}_o + \mathbf{L}_o \arrow[r, "\Delta G^o_{\text{kötési}}"] & \mathbf{ML}_o
\end{tikzcd}$$

Itt M a makromolekulát, L a ligandumot jelenti vákuumban és oldószerben (víz), ML a kötésben lévő komplexet, $\Delta G_{\text{kötési}}$ a kötési, míg ΔG_{szolv} a szolvatációs szabadenergiát jelenti vákuumban és oldószerben. A dokkolási szimulációból ki lehet számolni a $\Delta G^v_{\text{kötési}}$ értékét, valamint meg lehet becsülni a szolvatációs szabadenergia-értékeket külön-külön a makromolekulára és a ligandumra, valamint a komplexre. Mivel a szabadenergia állapotfüggvény, mely független attól, hogy milyen úton jutunk el egyik állapotból a másikba, a fenti termodinamikai ciklus alapján felírhatjuk a következő összefüggést:

$$\Delta G^o_{\text{kötési}} = \Delta G^v_{\text{kötési}} + \Delta G_{\text{szolv(ML)}} - \Delta G_{\text{szolv(M+L)}} \tag{4.33}$$

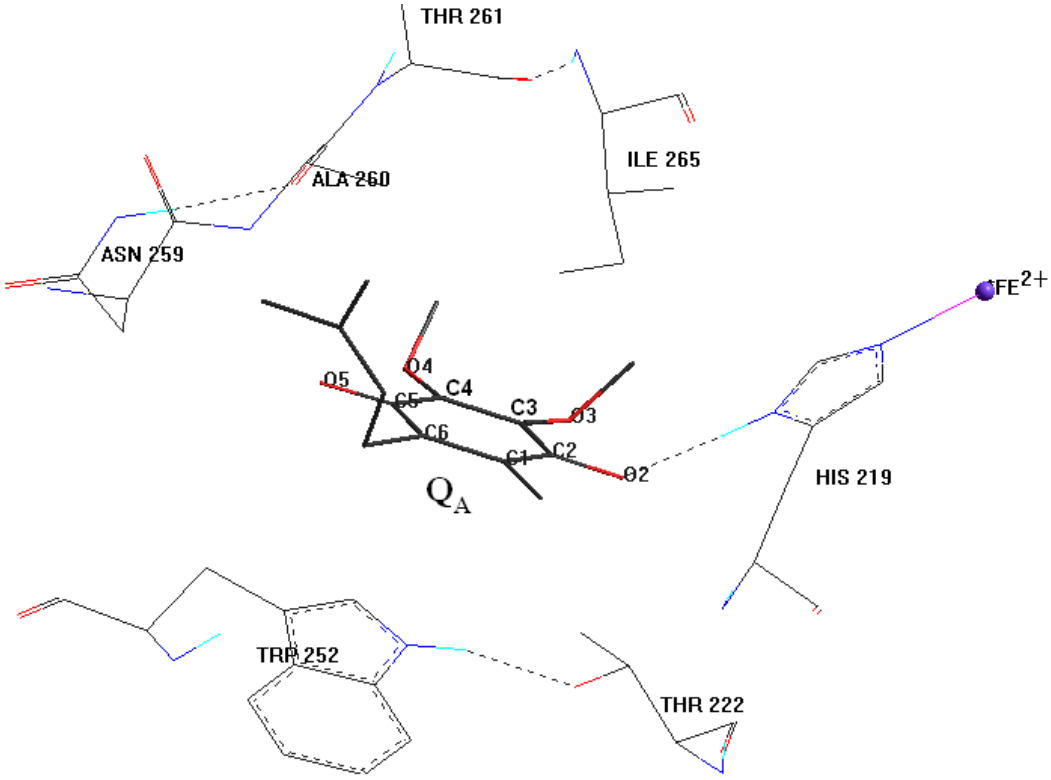
A (4.33) összefüggés az alapja a dokkolás segítségével meghatározható abszolút kötési szabadenergia megadásának makromolekula és ligandum alkotta komplex rendszer esetében.

5. fejezet

Eredmények és megvitatásuk

5.1. Fehérjekörnyezet hatása a kinon akceptor-rendszer energetikájára izolált reakciócentrumban

Az elsődleges és a másodlagos kinon a *Rhodobacter sphaeroides* fotoszintetizáló bíborbaktérium RC-ban kémiailag megegyezőek (mindkettő UQ_{10} molekula), mégis számos fizikai-kémiai tulajdonságban különbözőek. Ennek oka az eltérő fehérje-környezetnek tudható be.



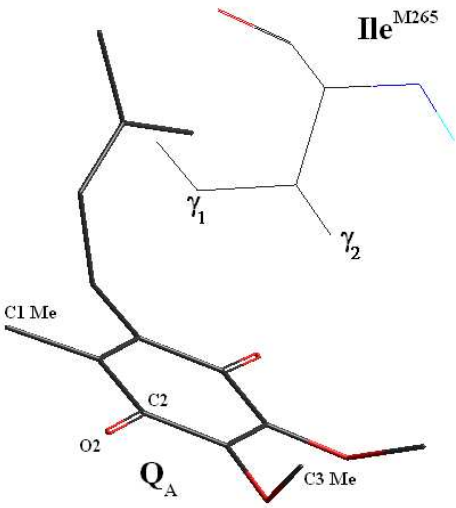
5.1 ábra. A Q_A kötőhelye az M-alegységben (*Rhodobacter sphaeroides* 1AIJ struktúra alapján [35]). A kinon izoprenoid láncát az első egységnél levágtuk. A lehetséges hidrogénhíd kötéseket a szaggatott vonalak mutatják.

A legnyilvánvalóbb különbség a redukálhatóság mértékében és energiájában van. Míg a primér kinon egy elektronnal redukálódik (a két elektronnal történő redukálás csak extrém

esetekben következhet be), addig a másodlagos kinon két elektron (és két proton) felvételével teljes redukcióra képes. A kinon/szemikinon redox pár középponti redoxpotenciálja is különböző a két kinonra: a primér kinon esetén a középponti redoxpotenciál 60 mV-tal negatívabb a másodlagos kinonénál (pH = 8). Ezekből következően a kinonok közötti (első és második) elektronátmenet sajátos kinetikai és termodinamikai tulajdonságú.

Az eltérő fehérjekörnyezetből származó konkrét befolyásoló tényezők (kölcsönhatások) között meg kell említeni a lokális elektrosztatikus potenciált a kinon kötőhelyen, a környezet protonfelvevő képességét (környező protonálható aminosavak helyi pK_a értéke), valamint a kötőhely közelében található poláros aminosavak számát. Az ubikinon középponti redoxpotenciálját és protonálhatósági tulajdonságait (pK_a értékét) meghatározó módon a kinon metoxi-csoportjainak és a kinongyűrű síkjának torziós szöge befolyásolja [108]. A szerkezeti adatok alapján érdekes információ, hogy mindkét kinon C5 karbonil-csoportja hidrogénhíd kötés távolságon belül van egy-egy hisztidin molekulával (Q_A-O5 - His^{M219}, Q_B-O5 - His^{L190}), melyek résztvesznek az Fe^{2+} körüli klaszter kialakításában is [128, 129, 130, 131].

Az elsődleges kinon kötőhelyét jobban megvizsgálva, látható, hogy a fent említett His^{M219}-en kívül a kötőhelyet apoláros aminosavak építik fel. A kinon fejcsoportját szendvicsként veszik közre a triptofán M252 és az izoleucin M265 aminosavak (5.1 ábra). A RC mutánsain elvégzett kísérletek mutattak rá a Trp^{M252} fontos szerepére: a triptofán és a Q_A $\pi - \pi$ kölcsönhatása nagyban hozzájárul az elsődleges kinon gyors redukciójához, valamint a kinonnak az adott kötőhelyre irányuló nagy kötési affinitásához [132, 133]. Emellett a Trp^{M252} és a Met^{M218} külön-külön egy-egy elektrontranszfer utat definiál az elsődleges kinon irányába, melyen keresztül a bakteriofeofitinről az elektron alagút-effektussal a Q_A-ra érkezhet [2, 3].

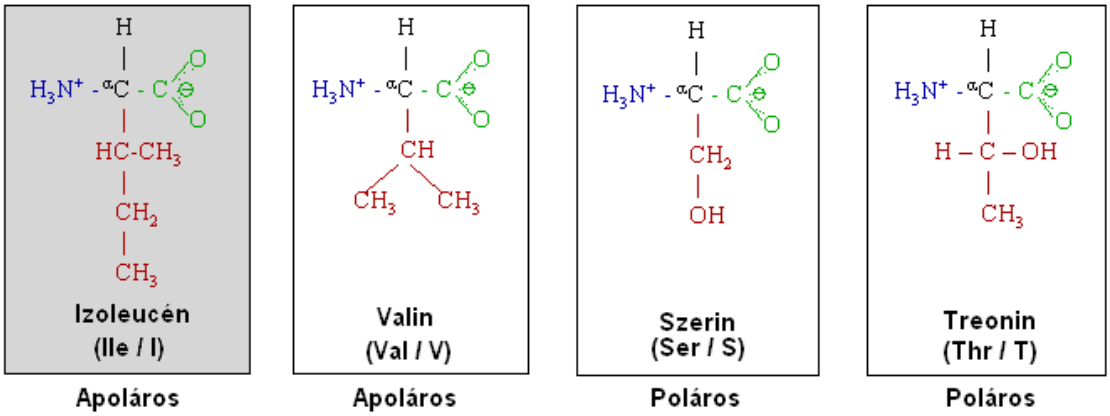


Ile^{M265}	Q_A	Távolság [Å]
γ_1	O2	3,98
γ_1	C2	3,85
γ_1	C1 Me	4,29
γ_1	C3 Me	4,52
γ_2	C3 Me	3,72
γ_2	O2	4,90

5.2 ábra. A Q_A és Ile^{M265} közötti van der Waals kapcsolat szemléltetése. A baloldali vázmodell a két molekula egymáshoz viszonyított helyzetét mutatja be, valamint a jobb oldali táblázatban bemutatott atomok helyzetét. A jobb oldali táblázatban a kitüntetett atomok közötti távolságokat szemléltetjük. Az ábra az 1AIJ struktúra alapján készült. A kinonmolekulát csak az első izopreniod egységig mutatjuk.

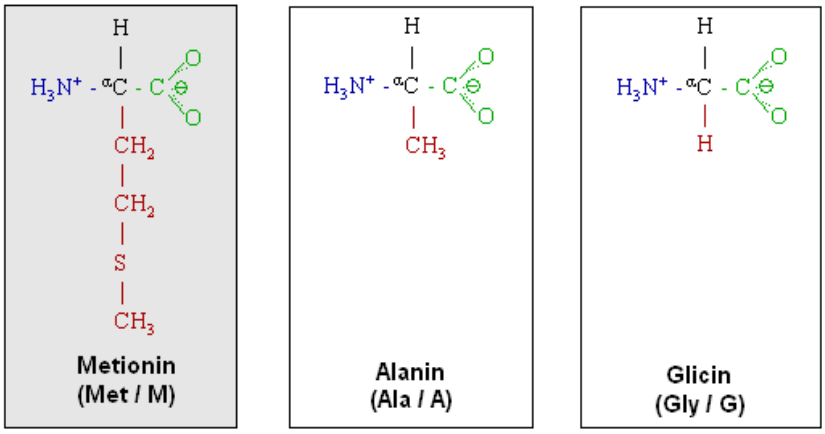
A Q_A bekötésének másik befolyásoló tényezője a környező aminosavakkal létesített van der Waals kapcsolatok [134, 135, 136]. Ebből a szempontból az Ile^{M265} fontos aminosav, mivel van der Waals kölcsönhatást alakít ki a kinon C3 metoxi-, a C5 karbonil-, és a C1

metilcsoportjával (5.2 ábra). Emiatt a vizsgálataink egyik csoportját azon mutáns törzsek képzik, ahol az Ile^{M265} aminosavat kisebb térkitöltésű aminosavra cserélték: valinra (M265IV), treoninra (M265IT), és szerinre (M265IS). Mivel az izoleucin apoláros aminosav, így a poláros szerinre és treoninra történő cseréje (a kötőhelynek a polárosság szempontjából való módosítása miatt is) érdekes változásokat eredményezhet a kinon *in situ* kötési- és redox-tulajdonságaiban.



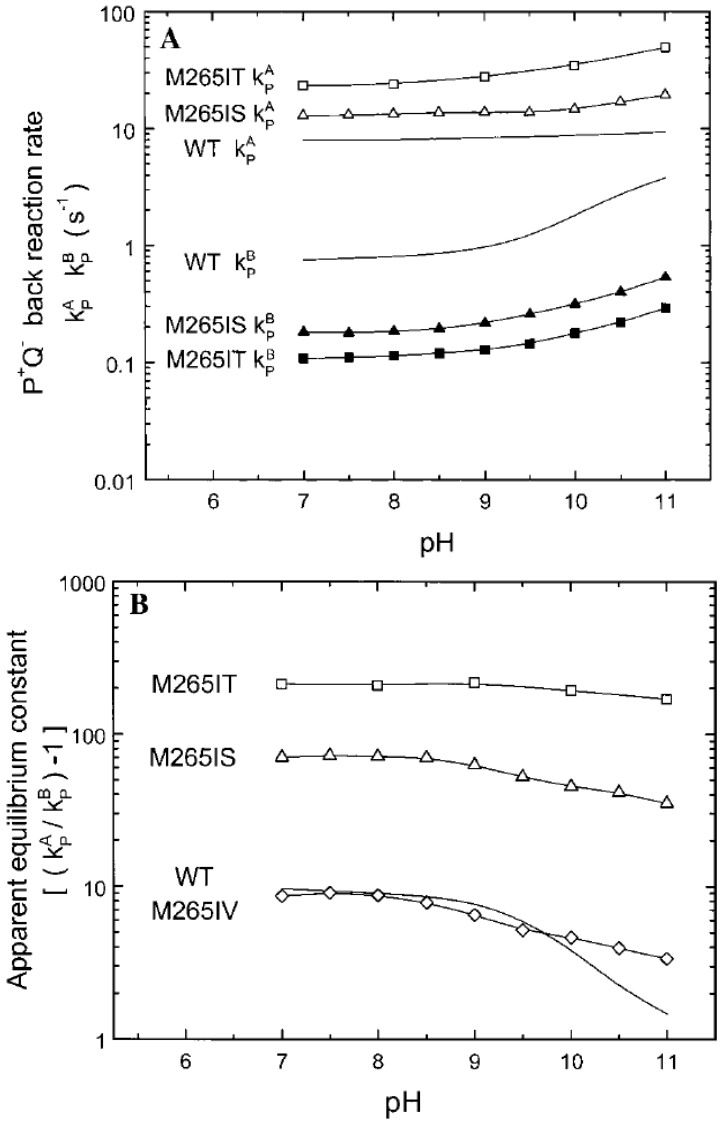
5.3 ábra. Az izoleucin, valin, szerin, és treonin aminosavak szerkezeti ábrázolása. Az eredeti képek a `http:/www.wikipedia.org` internetes szabadlexikon részét képezik.

A vizsgálataink egy másik csoportját azon mutáns törzsek képezik, melyek a korábban már említett metionin M218-at érintik. A Trp^{M252} mellett a Met^{M218} is az elektronoknak a Bfeo és a Q_A közötti alagutazásában játszik szerepet, így hasonló hatással lehetnek az elsődleges kinon energetikájára. A metionin kisebb térkitöltésű alaninra (M218MA) és glicinre (M218MG) lett kicserélve a két vizsgált mutánsban.



5.4 ábra. A metionin, alanin, és glicin aminosavak szerkezeti ábrázolása. Az eredeti képek a `http://www.wikipedia.org` internetes szabadlexikon részét képezik.

5.1.1. Ile^{M265} helyettesítések hatása a Q_A termodinamikai tulajdonságaira



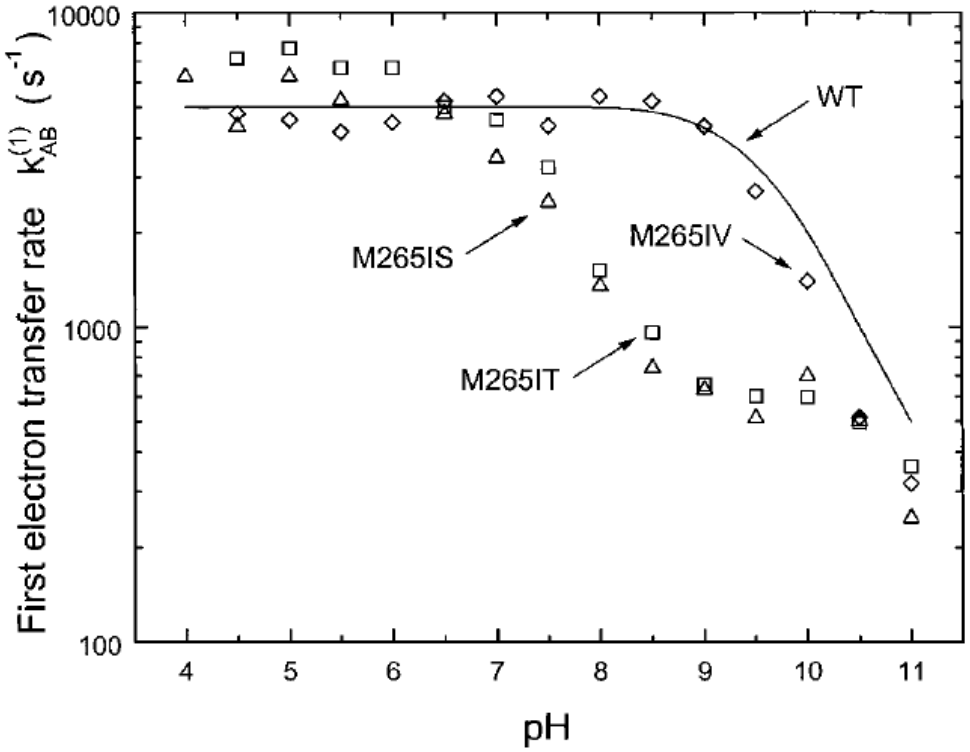
5.5 ábra. A töltésrekombináció pH-függése [108] alapján. (**A**) $P^+Q_A^-$ rekombináció, k_P^A (s^{-1}) (üres szimbólumok), és $P^+Q_AQ_B^-$ töltésrekombináció, k_P^B (s^{-1}) (telt szimbólumok) az M265IT (□, ■) és az M265IS (△, ▲) mutáns RC-ok, valamint Ga vadtípus (a vadtípusra vonatkozó adatok folytonos vonallal vannak jelölve: k_P^A felül; k_P^B alul) 430 nm-nél felvett abszorpcióváltozás mérések alapján. Az M265IV mutánsra vonatkozó adatok nincsenek feltüntetve, mivel ezek nagyon hasonlóak a Ga vadtípus eredményeihez.
(**B**) Látszólagos $P^+Q_A^-Q_B \longrightarrow P^+Q_AQ_B^-$ egyensúlyi elektrontranszfer (*Apparent equilibrium constant*) (k_P^A / k_P^B) - 1, az **A** ábra alapján számított adatok alapján. M265IT (□), M265IS(△), és M265IV (◇) mutáns RC-ok esetében. A Ga vadtípus adatait a folytonos vonal jelöli. Mérési körülmények: 1-2 μM RC 2,5 mM KCl, 1 mM pufferben, 0,02 % Triton X-100, 40 μM ubikinon-10 (ahol a k_P^B szerepel).

$P^+Q_A^-$ állapotból történő töltésrekombinációt vizsgáló korábbi kísérletek [108] eredményei (5.5 ábra és 5.6 ábra) azt mutatták, hogy az Ile^{M265} $\longrightarrow$ Val mutáció kismértékben

módosította a kinonok, illetve a RC működését. A vadtípus viselkedésétől való eltérés csak a $P^+Q_A^-Q_B \longrightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer látszólagos sebességi állandójának pH-függésében jelentkezik a magasabb pH tartományban. Ezzel szemben a két poláros mutáns (M265IS és M265IT) esetében a $P^+Q_A^-$-ról történő rekombináció sebességállandója (k_P^A) megnövekedett (5.5 ábra **A**).

Szintén növekedést mutat a $P^+Q_A^-Q_B \longleftrightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer látszólagos egyensúlyi állandója (5.5 ábra **B**), és az első elektrontranszfer sebességi állandójának ($k_{AB}^{(1)}$) pH-függése is eltérést mutat a vadtípus esetében mérhető értékektől.

A Q_A^- és Q_B közötti elektrontranszfer egyensúlyi állandójából indirekt módon meg lehet határozni a kinon középponti redoxpotenciáljának (E_m) változását a Q_A kötőhelyen. Az M265IT mutáns esetében ez az érték nagy csökkenést mutatott (80-110 mV) [108]. A csökkenés független volt a kinon típusától, nevezetesen mind az ubikinon-10, mind a 9,10-antrakinon esetében a Q_A kötőhelyen hasonló mértékű volt (összehasonlítva a vadtípusban mért értéket a mutánsokéval). A 9,10-antrakinonnál a metoxi-csoportok helyett metil-csoportok vannak, így a redoxpotenciálban bekövetkezett változás nem írható a metoxi-csoportok torziós mozgásában bekövetkező változás számlájára.



5.6 ábra. A $k_{AB}^{(1)}$ első elektrontranszfer sebességi állandó pH-függése [108] alapján. Ga vadtípus (adatait a folytonos vonal jelöli), valamint az M265IT (□), az M265IS(△), és az M265IV (◇) mutáns RC-ok 397 nm-nél mért adatai alapján.

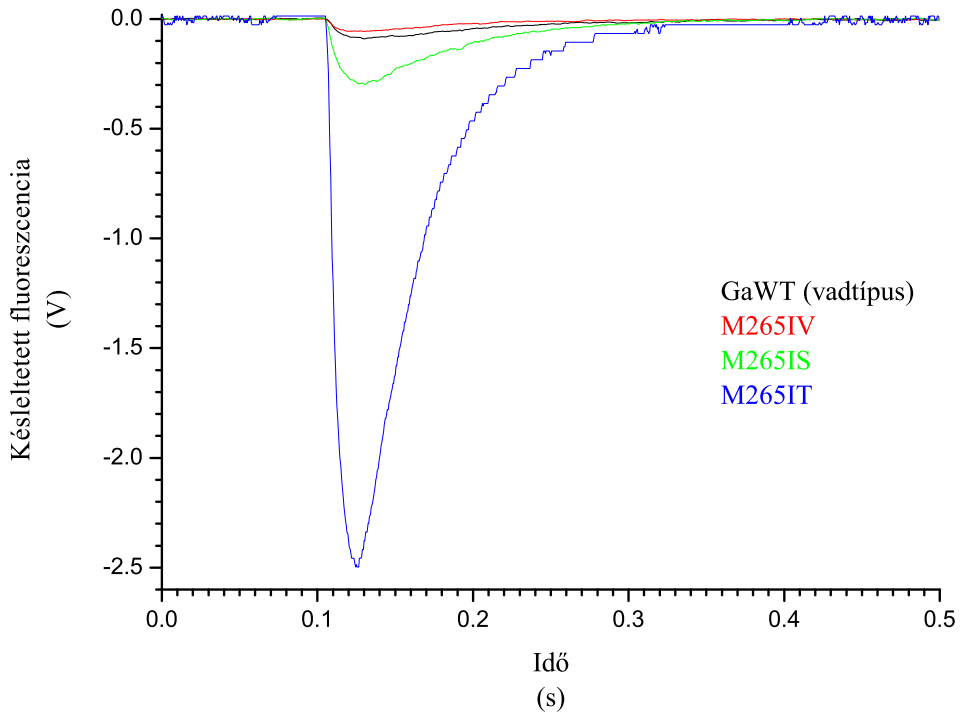
A Q_A és Q_B közötti funkcionális kapcsolat lehetősége miatt [137] a kinon középponti redoxpotenciál-változásának ilyen módon való meghatározása esetleges bizonytalanságot hordozhat magában. Ezzel szemben a késleltetett és a prompt fluoreszcencia intenzitás viszonyain alapuló, a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség meghatározására szolgáló módszer direkt és abszolút módszer, amely mentes az ilyen jellegű bizonytalanságot okozó faktoroktól.

A ΔG_{P^*A} meghatározására irányuló méréseink során egykinonos (csak a Q_A-ban aktív) RC-kat használtunk. Ilyen feltételt 1-2 μM RC tartalmú mintánál 100 μM terbutrin hozzáadásával értük el, amely ekkora mennyiségben teljesen gátolja a RC Q_B kötőhelyét. A szabadenergia-különbség változását a fiziológiás pH tartományban vizsgáltuk.

Méréseink során, hasonlóan a fent említett korábbi mérésekhez, a Ga zöld, karotinoidot tartalmazó törzset használtuk referencia vadtípusnak. Funkcionálisan és termodinamikai szempontok alapján a Ga törzs hasonló viselkedést mutat az R-26-os kékes-zöld, karotinoidmentes mutáns törzzsel, illetve a 2.4.1-es karotinoidot tartalmazó igazi vadtípussal. A P^* és $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség Ga, R-26, és 2.4.1 esetében is:

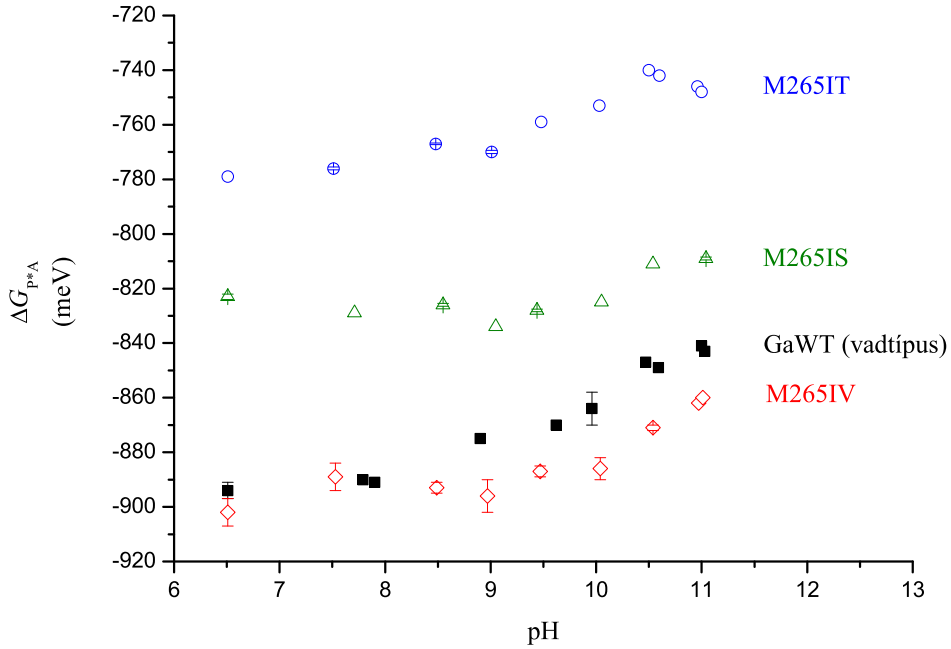
$$\Delta G_{P^*A} = \text{-890} \pm 5 \text{ meV (pH} = 8{,}0\text{-ra interpolálva)},$$

valamint nagyon hasonló pH-függést (Ga törzs esetén az 5.8 ábrán látható a vizsgált pH tartományban) is mutat mind a három törzs esetében (Turzó Kinga és Maróti Péter nem publikált mérései alapján).



5.7 ábra. A Ga vadtípus és a mutáns RC-ok által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia intenzitásának viszonyai pH = 9,5-nél. Jelölések: Ga vadtípus (fekete), M265IV (piros), M265IS (zöld), és M265IT (kék). Körülmények: 1-2 μM RC, 0,02 % Triton X-100, 2.5 mM pH puffer (MES, MOPS, Tricin, CHES és CAPS mindegyik 0,5 mM koncentrációban), 100 mM NaCl, valamint 100 μM terbutrin. A gerjesztő lézer fényt 0,1 másodpercnél kapták a minták, a megelőző tartományra (0,1 másodpercnyi rész) az alapvonal korrekció miatt van szükség. A mérés egyéb körülményei az "Anyagok és módszerek" fejezetben részletesen le vannak írva.

Az 5.7-es ábra a Ga vadtípus, valamint a három M265 mutáns késleltetett fluoreszcencia intenzitás viszonyait mutatja be pH = 9,5-nél. Látható, hogy az M265IV mutáns esetében kisebb, míg az M265IS és az M265IT mutáns esetében lényegesen nagyobb intenzitásokat mértünk. A késleltetett fluoreszcencia méréseink során mindig a lineáris tartományban maradtunk, mivel méréseink a ΔG_{P^*A} érték meghatározására irányultak.



5.8 ábra A P* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség pH-függésének ábrázolása Ga vadtípusú, és az M265-ös reziduum különböző mutációival előállított RC-ok esetében. A ΔG_{P^*A} értéket a késleltetett fluoreszcencia és a prompt fluoreszcencia mérések intenzitás viszonyai alapján számoltuk ki az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtak szerint. A körülmények megegyeznek az 5.7 ábra alatt leírtakkal.

Az M265IV mutáns RC a Ga vadtípushoz nagyon hasonló késleltetett fluoreszcencia intenzitást mutat a fiziológiás pH tartományban. (ΔG_{P^*A} = -890 ± 10 meV, pH = 8,0-ra interpolálva). Eltérés csak a magasabb pH értékek felé jelentkezett (5.8 ábra). pH = 10,5-nél a ΔG_{P^*A} érték 20 meV-tal negatívabb az M265IV mutáns RC esetében, mint amit Ga vadtípusú RC-k esetében meghatároztunk.

Ezen eredményekkel szemben a két poláros mutáns RC (M265IS és M265IT) esetén a késleltetett fluoreszcencia intenzitás a fiziológiás pH tartományban sokkal nagyobb volt, mint amit a Ga vadtípusú RC-nél mértünk, így a P* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség sokkal kisebb ezen mutánsoknál. Ebből következik, hogy az M265IS és M265IT mutáns RC esetében a kinon redoxpotenciálja a Q_A helyen sokkal negatívabb. A számított szabadenergia-értékek pH = 8,0-ra interpolálva a következők voltak:

$$\text{M265IS } \Delta G_{P^*A} = \text{-830} \pm 10 \text{ meV}$$

$$\text{M265IT } \Delta G_{P^*A} = \text{-775} \pm 5 \text{ meV}$$

Összehasonlítva ezeket a vadtípusú RC esetében kapott értékekkel a kinon középponti redoxpotenciál eltolódásának mértéke a Q_A kötőhelyen M265IS esetében -60 mV, míg M265IT esetében -115 mV.

A Ga vadtípuson, illetve a három M265-ös mutánson végzett FTIR spektroszkópiai vizsgálatok során [138] ^1H_2O és ^2H_2O dupla differencia spektrumot vettek fel. Az apoláros (Ile, Val) és a poláros (Ser, Thr) reziduumok differencia spektrumai több helyen is szignifikáns eltérést mutattak. Ezért megmértük a Ga vadtípus, és az M265IS mutáns RC késleltetett fluoreszcenciáját ^2H_2O-ban. pH/pD 7 - 10,5 tartományban nem találtunk szignifikáns különbséget. M265IS esetében pH/pD = 9,8-nál:

ΔG_{P^*A} = -830 meV, ^1H_2O-t használva
ΔG_{P^*A} = -829 meV, ^2H_2O-t használva.

Eredményeinket összevetve a korábbi töltésrekombinációra vonatkozó kísérleti eredményekkel, illetve az FTIR spektroszkópiai eredményekkel a következő megállapításokat tehetjük:

A $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ első elektrontranszfer egyensúlyi állandójának növekedését figyelték meg az Ile^{M265} kisebb térkitöltésű poláros aminosavak, szerin, és treonin helyettesítésével előállított mutáns RC-ok esetében [108]. Ez a növekedés konzekvens volt az elsődleges kinonnál tapasztalt középponti redoxpotenciál eltolódással, mely a natív ubikinon-10 esetében -50 mV, illetve -80 mV volt az M265IS és M265IT mutáns RC-nál az indirekt módon való meghatározással. Az antrakinonos helyettesítések hasonló eredményre vezettek. Az E_m a Q_A helyre vonatkozóan a vadtípushoz képest (Ga) 80, illetve 105 mV eltolódást mutatott M265IS és M265IT mutáns RC-nál. Ezekből az eredményekből következik, hogy a mutációk által létrehozott változásnak főként a Q_A energetikai tulajdonságaira van hatása, míg a Q_B-re nagyon csekély befolyással bír.

A Ga karotinoidot tartalmazó, valamint az R-26 karotinoid-mentes RC-ra vonatkozó késleltetett fluoreszcencia mérésekből látszik, hogy a két törzs esetében a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség megegyezik egymással, valamint a $P^+Q_A^-$ állapotból származó késleltetett fluoreszcencia intenzitás is ugyanakkora.

A mutánsokra vonatkozó méréseinkből látszik, hogy pH = 8,0-nál mind a késleltetett fluoreszcencia intenzitás, mind a ΔG_{P^*A} szabadenergia-különbség az apoláros M265IV mutáns és a Ga vadtípusú RC-ok esetében megegyezik. Az is megfigyelhető azonban, hogy ez a magasabb pH tartományokban már eltérést mutat.

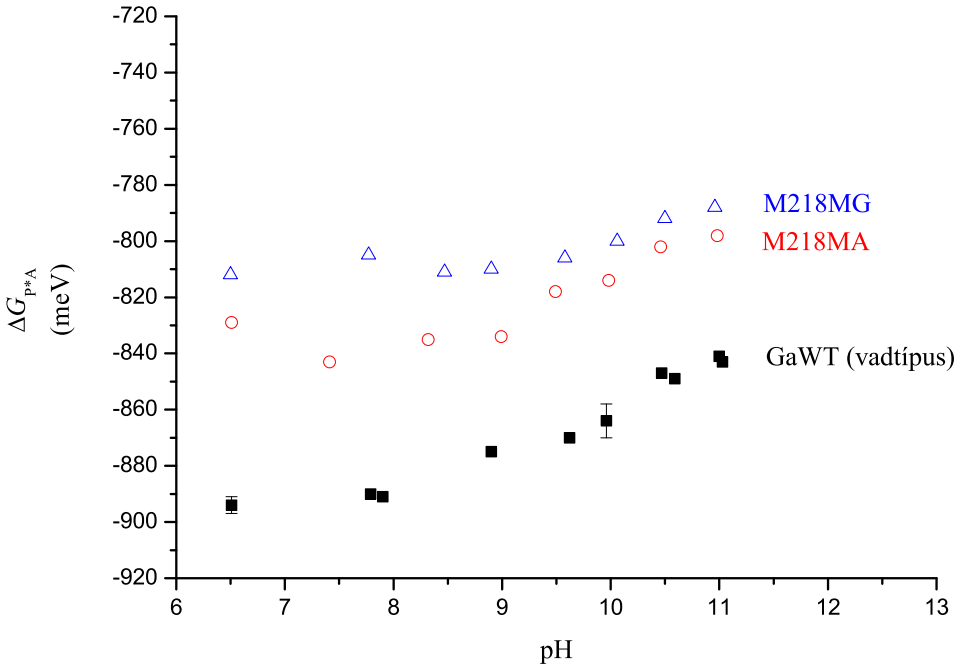
A poláros mutánsok ezzel szemben pH = 8,0-nál a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergia-szintjét közelebb tolják a P^* állapot szabadenergia-szintjéhez, és láthatóan megnövekszik a késleltetett fluoreszcencia intenzitása (lásd 5.7 ábra). Ez az eltolás 60 meV az Ile $\longrightarrow$ Ser mutáció esetében, és 115 meV az Ile $\longrightarrow$ Thr mutáció esetében. Ha összehasonlítjuk ezt az antrakinonos helyettesítésnél kapott a töltésrekombináció kinetikájából indirekt módon számított Q_A-ra vonatkozó E_m értékekkel, ami -80 mV M265IS-nél és -105 mV M265IT-nél (pH = 8,0) [108], akkor egészen jó egyezést láthatunk.

Az FTIR mérések egyik eredménye rámutat a Q_A redoxpotenciál eltolódásának lehetséges okára a poláros mutánsok esetében [138]. A differencia spektrumokból látszik, hogy a poláros mutánsoknál változás következhet be a kinon karbonil oxigénje és a környező aminosav környezet között kialakult hidrogénhíd kötés távolságban. A szerin és a treonin hidroxil csoportja hidrogénhíd kötést alakíthat ki a Thr^{M261}-es reziduum peptid karbonil csoportjával, és ezzel az M259-M262 reziduum csoport (Asn^{M259} - Ala^{M260} - Thr^{M261} - Met^{M262}) peptidvázát megfeszíti, és eltolja a kinon környezetéből. Ezzel eltávolítja például az Ala^{M260}-at, mely a dokkolási és molekuladinamikai szimulációk alapján hidrogénhíd

kötés távolságon belül helyezkedik el a natív ubikinon-10 C2=O karbonil csoportjához képest.

Egy másik érdekes eredménye az FTIR méréseknek, hogy a poláros mutánsok esetében az infravörös spektrum szemikinon anion sávja nagyon érzékeny volt a ^2H_2O-ra, ellentétben a Ga és az M265IV apoláros RC-kal [138]. Ebből az eredményből arra lehetett következtetni, hogy változás állhat be a kinon és környezete között kialakított hidrogénhíd kötések erősségében. A $^2H/^1H$ helyettesítés természetesen nem hat magára a hidrogénhíd kötés erősségre, ellenben ha a kötési potenciál elegendően anharmonikus, akkor befolyásolhatja azt. Úgy gondoltuk, hogy ennek az effektusnak meg kell jelennie a ΔG_{P^*A} értékben is a poláros mutánsok esetében, de azt találtuk, hogy M265IS mutáns RC esetében a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség nagyságát nem befolyásolta a $^2H/^1H$-s helyettesítés.

5.1.2. Met^{M218} helyettesítések hatása a Q_A termodinamikai tulajdonságaira



5.10 ábra A P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség pH-függésének ábrázolása Ga vadtípusú és az M218-as reziduum különböző mutációival előállított RC-ok esetében. A ΔG_{P^*A} értéket a késleltetett fluoreszcencia és a prompt fluoreszcencia mérések intenzitás viszonyai alapján számoltuk ki az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtak szerint. A körülmények megegyeznek az 5.7 ábra alatt leírtakkal.

Az 5.10 ábrán láthatjuk a Ga vadtípusú és a két M218-as mutáns RC ΔG_{P^*A} értékének pH-függését a fiziológiás pH tartományban. Az M218MA mutáns RC esetében nagyon hasonló a pH-függés, mint amit az M265IS mutáns RC-nél kaptunk. Az M218MG pedig

még inkább a P* szabadenergia-szintje felé tolta el a $P^+Q_A^-$ állapot szintjét. pH = 8,0-ra interpolálva a két mutánsra a következő értékeket kapjuk:

$$\text{M218MA } \Delta G_{P^*A} = \text{-835} \pm 20 \text{ meV}$$
$$\text{M218MG } \Delta G_{P^*A} = \text{-805} \pm 10 \text{ meV}$$

Ezek a szabadenergia-szintek a Q_A redoxpotenciál eltolódására -55 és -85 mV-ot jelentenek az M218MA és az M218MG esetében.

430 nm-nél felvett töltésrekombinációs kinetikák alapján a két mutáns esetében szobahőmérsékleten pH = 8,0-nál a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ rekombinációs folyamat sebességi állandójának emelkedését figyeltük meg. A k_P^A értékére Ga vadtípus esetében 9 s^{-1}, míg M218MA-nál 27 s^{-1}, M218MG-nél pedig 38 s^{-1}-ot kaptunk.

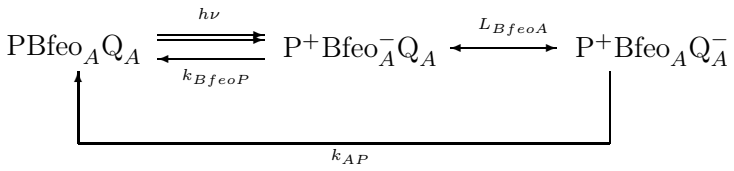
A másodlagos kinonról történő töltésrekombináció ($P^+Q_AQ_B^- \longrightarrow PQ_AQ_B$) sebességi állandója ($k_P^B$) Ga vadtípus esetén pH = 8,0-nál $\approx$ 0,8 s^{-1}, ami sokkal kisebb, mint a $P^+Q_A^-$ állapotról történő töltésrekombináció sebessége ($\approx$ 10 s^{-1}). M218MA és M218MG mutáns RC-ok esetében a megfigyelt sebességi állandóra még ennél is kisebb értéket kaptunk: 0,40 s^{-1} és 0,22 s^{-1}. Összehasonlítva ezeket az értékeket a $P^+Q_A^-$ állapotból történő rekombináció sebességével (mely sokkal gyorsabb folyamat) a Q_A és Q_B közötti elektrontranszfer egyensúlyi állandójára ($L_{AB}^{(1)}$) egyre nagyobb értéket kapunk (5.1 táblázat).

	k_P^A (s^{-1})	k_P^B (s^{-1})	$L_{AB}^{(1)}$	$k_{AB}^{(1)}$ (s^{-1})	$k_{AB}^{(2)}$ (s^{-1})
GaWT	9,5	0,80	10	$4 \cdot 10^3$	10^3
M218MA	27,0	0,40	65	$4 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
M218MG	38,0	0,22	172	$4 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$

5.1 táblázat. M218-as mutáns RC-ok elektrontranszfer karakterisztikájának összehasonlítása a Ga vadtípusú RC-mal, pH = 8,0-nál.

A $Q_A^-Q_B \longrightarrow Q_AQ_B^-$ közötti elektrontranszfer sebességi állandója ($k_{AB}^{(1)}$) pH = 8,0-nál mindkét mutáns RC esetében megegyezik a Ga vadtípusnál kapott értékkel: $4 \cdot 10^{-3}$ s^{-1} (5.1 táblázat). A második elektrontranszfer ($Q_A^-Q_B^- \longrightarrow Q_AQ_BH_2$) sebességi állandója ellenben kétszer nagyobb az egész fiziológiás pH tartományban az M218 mutáns RC-ra, mint a Ga vadtípusra (5.1 táblázat).

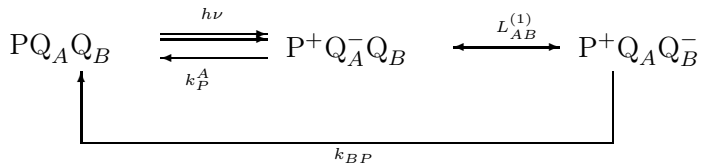
Az M218-as mutáns RC-ok esetében a $P^+Q_A^-$ állapotból történő töltésrekombináció szignifikánsan gyorsabb, mint a vadtípusú RC esetében. Natív ubikinon-10-nél és vadtípusú RC-nál a töltésrekombináció alagutazással történik a Q_A-ról a P^+-ra [139]. Ellenben, ha mutáció hatására a Q_A redoxpotenciálja alacsonyabbá (negatívabbá) válik, akkor a $P^+Bfeo_A^-$-on keresztüli termikus aktivációs út is megnyílik.



Így a $P^+Q_A^-$ állapotból történő rekombináció teljes (látszólagos) sebességi állandója a következő:

$$k_P^A = k_{BfeoP} \cdot exp(\frac{\Delta G_{BfeoA}}{RT}) + k_{AP} = \frac{k_{BfeoP}}{(1 + L_{BfeoA})} + \frac{k_{AP} \cdot L_{BfeoA}}{(1 + L_{BfeoA})} \tag{5.1}$$

A $P^+Q_A^-$ állapotból történő töltésrekombináció sebességének felgyorsulása (k_P^A) vitathatatlan jele a termikus aktivációs út bekapcsolódásának. A Q_A redoxpotenciáljának eltolódását viszont nem lehet egyértelműen a $P^+Q_A^-$ rekombinációs kinetikából meghatározni. A $P^+Q_B^-$ állapotból történő rekombinációból szintén információt nyerhetünk a Q_A középponti redoxpotenciáljára a $P^+Q_A^-Q_B$ és $P^+Q_AQ_B^-$ közötti elektrontranszfer egyensúlyi állandójának ($L_{AB}^{(1)}$) segítségével. A következő folyamatábra alapján az $L_{AB}^{(1)}$ meghatározható a töltésrekombinációs kinetikából:



A rekombináció látszólagos sebességi állandója a következő összefüggéssel adható meg:

$$\begin{aligned} k_P^B &= k_{BfeoP} \cdot exp(\frac{\Delta G_{BfeoB}}{RT}) + k_P^A \cdot exp(\frac{\Delta G_{AB}^{(1)}}{RT}) + k_{BP} \\ &\approx k_P^A \cdot exp(\frac{\Delta G_{AB}^{(1)}}{RT}) + k_{BP} = \frac{k_P^A}{(1 + L_{AB}^{(1)})} + \frac{k_{BP} \cdot L_{AB}^{(1)}}{(1 + L_{AB}^{(1)})} \end{aligned} \tag{5.2}$$

A $P^+Q_AQ_B^-$ állapotból a direkt rekombinációs út sebességi állandója (k_{BP}) kis érték vadtípusú RC-nál 0,1 - 0,2 s^{-1} [84], míg L213DN mutáns esetében (L213-as aszparaginsav van kicserélve neutrális aszparaginra) 0,04 - 0,06 s^{-1} [78]. Ennél a k_P^A százszor nagyobb, ezért míg az $L_{AB}^{(1)}$ egyensúlyi állandó nem túl nagy érték, addig a k_{BP} elhanyagolható. Ilyen körülmények között a $P^+Q_A^-$, illetve a $P^+Q_B^-$ rekombinációkból kapott k_P^A és k_P^B értékek felhasználhatóak az egyensúlyi állandó meghatározásához [53, 81]:

$$L_{AB}^{(1)} \approx \frac{k_P^A}{k_P^B} - 1 \tag{5.3}$$

Ez az összefüggés kellően megalapozott a vadtípusú RC esetében, ahol az $L_{AB}^{(1)} \approx 15$ és a látszólagos sebességi állandója a $P^+Q_B^-$ töltésrekombinációnak tízszer nagyobb, mint a k_{BP}. Az M218MA és M218MG mutánsokra alkalmazva ezt az összefüggést az $L_{AB}^{(1)}$ értéke 65 és 172. Takahashi és mtsai [108] rámutattak az M265 poláros mutánsok esetében arra, hogy az ilyen módon meghatározott értékek alulbecslik a tényleges $L_{AB}^{(1)}$-t, valamint a Q_A és Q_B közötti szabadenergia-különbség változására minimális értéket adnak. Ez a minimum érték M218MA esetében -30, míg M218MG esetében -70 meV.

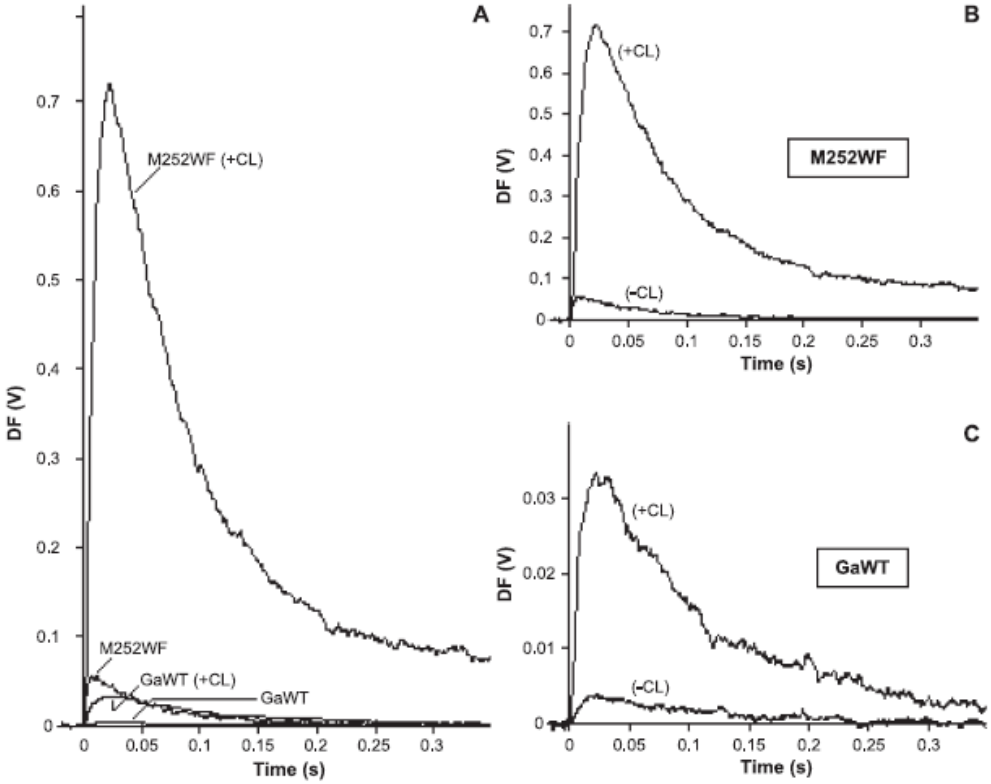
A késleltetett fluoreszcencia kísérleteink igazolták az elsődleges kinon középponti redoxpotenciáljának eltolódását az M218-as mutáns RC-nál. A ΔG_{P*A} értéke 55, illetve 85 meV-tal csökkent az M218MA és M218MG mutánsoknál pH = 8,0-nál a vadtípusnál kapott szabadenergia-különbséghez képest. Ezek az értékek kellő összhangban vannak a $Q_A^-Q_B \longleftrightarrow Q_AQ_B^-$ közötti elektrontranszfer egyensúlyi állandójára kapott alsó közelítéssel, melyek 35 és 70 meV-ot adtak M218MA-ra és M218MG-re.

A RC struktúráját alapul véve az M218-as mutánsok viselkedésének teljes magyarázata még nem ismeretes. A helyettesített alanin és glicin aminosavak sokkal kisebb térkitöltésűek, mint a vadtípus metioninja, mely a $Bfeo_A$ és a Q_A között helyezkedik el, és az elektronok Bfeo-ről Q_A-ra történő alagutazásában játszik kulcsszerepet. Az elektronoknak a metionon keresztüli út mellett a Trp^{M252}-on át vezető útvonal is rendelkezésére áll, és közelítőleg azonos valószínűséggel veszik igénybe a primér kinon redukálására [2, 3]. A Q_A helyen natív ubikinon-10-nek antrakinonnal való helyettesítésénél a töltésrekombinációkból meghatározott redoxpotenciál eltolódás kisebb mértékű volt az M218-as mutáns RC-nál (E. Takahashi nem publikált adatai alapján), így lehetséges az a magyarázat, hogy a kisebb térkitöltésű aminosavak miatt több vízmolekula helyezkedik el az elsődleges kinon környezetében. Ezzel megváltozik annak sztérikus és elektrosztatikus kölcsönhatása a környezetével. Az antrakinon, mivel jobban kitölti a rendelkezésre álló teret, kevesebb plusz vízmolekula bejutását engedi a megnövekedett térbe, így kisebb mértékű a redoxpotenciál eltolódása.

5.2. Lipidkörnyezet hatása a kinonok viselkedésére izolált reakciócentrumban

A kardiolipin (difoszfatid-glicerol) négy acil lánccal rendelkező negatívan töltött lipidmolekula. A rendelkezésre álló röntgen diffrakciós szerkezetek alapján [33, 140] látszik, hogy a kardiolipin a RC specifikus helyeire kötődik. A kardiolipin fejcsoportja a membrán citoplazmikus oldal felől kötődik a három fehérjealegységhez a két kinontól körülbelül 18 Å távolságra.

Detergensben lévő izolált RC-hoz kardiolipint adva a másodlagos kinonról történő töltésrekombináció ($P^+Q_B^- \longrightarrow PQ_B$) nagymértékben lelassult. Az effektus a fél telítési állapotot 10-20 μM kardiolipin hozzáadása esetén érte el. Mivel izolált RC esetében a töltésrekombináció a másodlagos kinonról főként a $P^+Q_A^-$-on keresztül indirekt módon történik [63, 81, 141], így emiatt a $Q_A^-Q_B \longleftrightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer egyensúlyi állandója megnövekszik. Ez a lassulás 100 μM kardiolipin hozzáadása esetén pH = 8,0-nál körülbelül háromszoros, ami a Q_A/Q_A^- és Q_B/Q_B^- szabadenergia-szintek közötti különbség 30 meV-os növekedésére utal. Ez a növekedés a két állapot közötti szabadenergia-különbségben az egész fiziológiás pH tartományban (pH = 6-tól 10.5-ig) állandó marad. Kardiolipin hozzáadása esetén a lassú fázis relatív amplitúdója 70%-ról 90%-ra nő a töltésrekombináció kinetikájában, ami a Q_B hely betöltöttségének növekedését jelenti.



5.11 ábra. A kardiolipin hatása a RC késleltetett fluoreszcencia emissziójára. GaWT vadtípusú RC (**A** és **C** ábra), $Trp^{M252} \longrightarrow$ Phe mutáns RC (M252WF) (**A** és **B** ábra) hozzáadott kardiolipinnel (+CL) és anélkül (-CL). A mérési körülmények megegyeznek az 5.7 ábra alatt leírtakkal, a hozzáadott kardiolipin koncentráció 100 μM volt.

Megfigyeltük, hogy a kardiolipin ezenkívül a második elektrontranszfer ($Q_A^- Q_B^- \longrightarrow Q_A Q_B H_2$) kismértékű felgyorsulását is eredményezi. A sebességi állandó ($k_{AB}^{(2)}$) 1,5 - 2 szeresre növekszik a fiziológiás pH tartományban.

Egykinonos (tebutrinnal gátoltuk Q_B kötőhelyet) izolált Ga vadtípusú RC esetében a késleltetett fluoreszcencia intenzitása 5-7-szeresére nőtt kardiolipin jelenlétében (5.11 ábra **C**). A ΔG_{P^*A} szabadenergia-különbség értéke 30 ± 10 meV-tal csökkent a kardiolipin hozzáadását követően. M252WF mutáns RC ($Trp^{M252} \longrightarrow$ Phe (fenilalanin)) esetében hasonló effektust figyelhettünk meg, itt a szabadenergia-különbség 50 ± 10 meV-tal csökkent a lipid hozzáadására (5.11 ábra **A** és **B**).

A $P^+Q_A^-$ állapotból mérhető késleltetett fluoreszcencia intenzitásának növekedése, valamint a másodlagos kinonról történő töltésrekombináció lassulása arra utal, hogy a kardiolipin bekötődése a RC-hoz 30 - 40 mV-tal eltolja az elsődleges kinon középponti redoxpotencálját negatív irányban. A kardiolipin Q_A-ra gyakorolt hatása nem nagy mértékű, mégis egyfajta járulékos képet nyújt a natív membránban tapasztalható nagyobb egyensúlyi állandóra a Q_A és a Q_B közötti elektrontranszfernek, szemben az izolált RC-ban kapott értékkel (lásd a későbbi fejezetet).

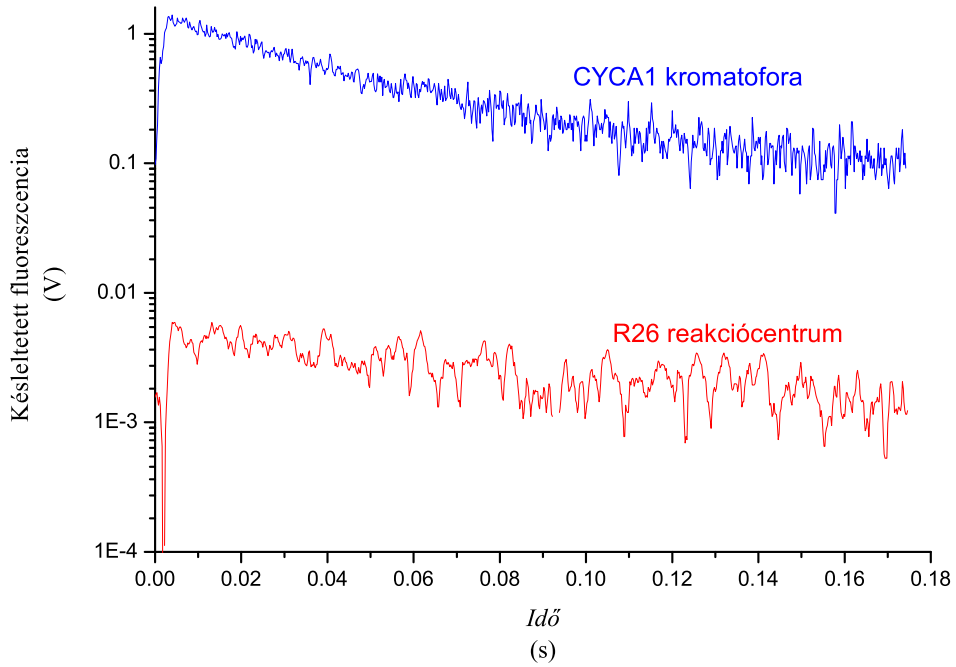
Érdekes, hogy a kardiolipin hatása csak az elsődleges kinon energetikáját változtatja meg, pedig a strukturális képet tekintve látható, hogy a lipid kötőhelye a kinonoktól egyenlő távolságra helyezkedik el. A hatás feltehetőleg fehérje-lipid kölcsönhatáson keresztül jelentkezik. Az M267-es arginin reziduummal közvetlen kapcsolatban van a kardiolipin. Az Arg^{M267} része a Q_A kötőhelynek, valamint só-hidat létesít a Glu^{M263}-mal, mellyel közrefogja az M265-ös reziduumot. Ez a só-híd stabilizálja az M-alegység E jelű α-hélix felső részét (a D és az E hélixben helyezkednek el a Q_A kötőhely lehorgonyzó pontjai).

5.3. Reakciócentrum természetes membránban: Kromatofora késleltetett fluoreszcenciája

A fotoszintetizáló baktériumok szervezeti hierarchiáját szem előtt tartva a detergenssel oldatba vitt RC késleltetett fluoreszcenciájának tárgyalása után a membrán-fragmentumokba ágyazott RC (kromatofora) késleltetett fluoreszcenciáját vizsgáljuk. Számos új jelenség figyelhető meg, amelyek a RC-fehérje körül kialakult szerkezeti különbségeket tükrözik. Ezek tanulmányozása értékes, és sokszor más eszközökkel elérhetetlen eredményeket hozhat.

5.3.1. Izolált és membrán-fragmentumba ágyazott reakciócentrum késleltetett fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása

Izolált kromatofora késleltetett fluoreszcenciájának intenzitása körülbelül két nagyságrenddel nagyobb, mint amit a megegyező koncentrációjú izolált RC-on mérhetünk (5.11 ábra).



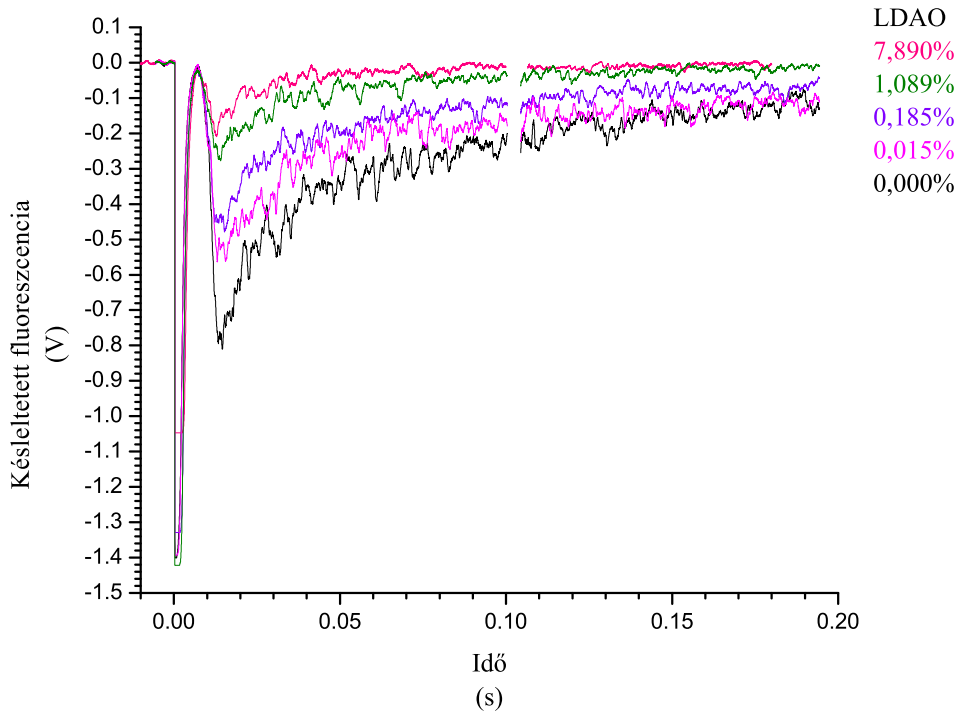
5.11 ábra Kromatofora és izolált RC által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlítása. Körülmények: RC-koncentráció $\approx$ 0,320 μM, pH = 9,05, T = 298 K mindkét esetben. Kromatofora esetében: 10 mM Trisz, 10 mM Ches, 100 mM NaCl, 5 μM valinomicin és 100 μM terbutrin. RC esetében: 0,02% Triton X-100, 0,5 mM Ches, 100 mM NaCl és 100 μM terbutrin. A kinetikákat 128 jel átlagolásával kaptuk.

Az előző fejezetben láttuk, hogy a fehérje-lipid kölcsönhatás módosítja az elsődleges kinon középponti redoxpotenciálját, és ily módon a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergia-szintjét. A kinon középponti redoxpotenciálját negatív irányban eltolja, ezzel a $P^+Q_A^-$ állapot és a

P* állapot közötti szabadenergia-különbséget lecsökkenti, aminek következtében a $P^+Q_A^-$ állapothoz kapcsolódó késleltetett fluoreszcencia intenzitása növekedni fog. Egy másik a késleltetett fluoreszcencia intenzitását növelő körülmény, hogy izolált kromatofora esetében a RC-on kívül az antenna-komplex is jelen van, mely erősítő hatást fejthet ki a bakterioklorofill által kibocsátott fluoreszcencia intenzitására.

Az 5.11 ábrán bemutatott méréseknél az izolált kromatofora és az izolált RC esetében is inhibítort alkalmaztunk, mellyel a másodlagos kinont gátoltuk. Látható, hogy a RC késleltetett fluoreszcencia kinetikájával szemben - mely egy komponensű és a $P^+Q_A^-$ állapothoz köthető - a kromatofora esetében két komponensű lecsengést kaptunk. A lassú komponens élettartama megfelel a 605 nm-nél mért töltésrekombinációban is megfigyelhető, az elsődleges kinonra jellemző fázis élettartamával. A gyors komponens ezzel szemben csak a késleltetett fluoreszcencia kinetikában jelentkezett, az abszorpció-változásban nem.

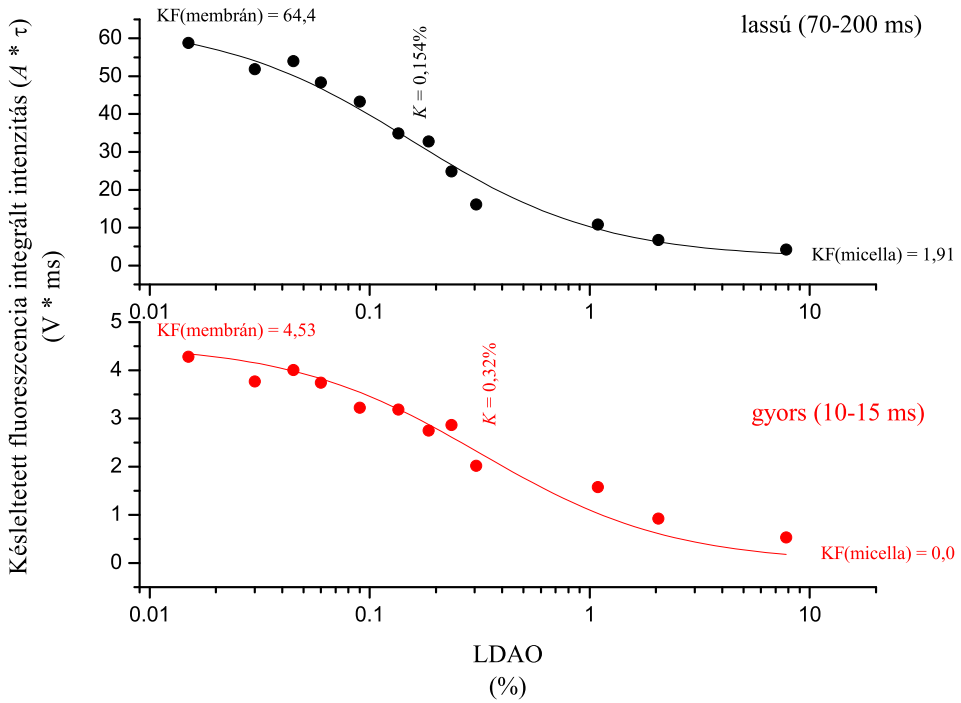
5.3.2. Detergens-hatás vizsgálata



5.12 ábra Detergens (LDAO) hatása a kromatofora (CYCA1) által kibocsátott késleltetett fluoreszcenciára. Mérési körülmények: RC-koncentráció 0,32 μM, 10 mM Trisz, 10 mM KCl, 10 mM CAPS, 2 μM stigmatellin és pH = 10,3. A kinetikákat 128 jel átlagolásával kaptuk. A rendszer a gerjesztő lézerimpulzust t = 0 s-nál kapta.

Kromatofora esetében a RC-fehérje, valamint az antenna-rendszer tagjai a kettős lipidmembránban helyezkednek el. Amennyiben detergenst (LDAO) adagolunk a rendszerhez a különböző integrális membránfehérjék szeparálódni fognak az intracitoplazmikus membránból. Ez a szeparáció egyrészt megszünteti a RC esetében a fehérje-lipid kölcsönhatást, másrészt eltávolítja a RC-okat az antenna-rendszer fehérjéitől. Mindkét hatás a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának csökkenését eredményezheti.

Méréseink alapján kijelentheő, hogy növekvő detergens koncentrációval csökken a késleltetett fluoreszcencia intenzitása (5.12 ábra).



5.13 ábra Detergens hatása az izolált kromatofora (CYCA1) által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitására. A kromatofora késleltetett fluoreszcencia kinetikáját két komponensre bontottuk. A lassú (fekete), és a gyors (piros) komponens integrált intenzitásait ábrázoltuk a detergens (LDAO) koncentráció függvényében. Az adatokra a szövegben részletesen leírt modellfüggvényt illesztettük. Az illesztés paraméterei a megfelelő komponensekre vonatkozóan az ábrán fel vannak tüntetve. A mérési körülmények megegyeznek az 5.12 ábrán leírtakkal.

Az LDAO koncentrációtól függően a RC-fehérje vagy a membránban vagy a detergens által kialakított micellákban helyezkedik el. Ezen két állapot között egyensúly alakul ki:

$$\mathrm{RC_{membrán}} + \mathrm{LDAO} \overset{K}{\longleftrightarrow} \mathrm{RC_{micella}} \tag{5.4}$$

Az egyensúlyra, valamint a RC mennyiségének az állandóságára a következő két egyenletet írhatjuk fel:

$$K = \frac{[\mathrm{RC_{membrán}}] \cdot [\mathrm{LDAO}]}{[\mathrm{RC_{micella}}]} \tag{5.5}$$

$$[\mathrm{RC}] = [\mathrm{RC_{membrán}}] + [\mathrm{RC_{micella}}] \tag{5.6}$$

A mért késleltetett fluoreszcencia intenzitás (**KF**) az egyes állapotokra jellemző késleltetett fluoreszcencia intenzitások súlyozott összege:

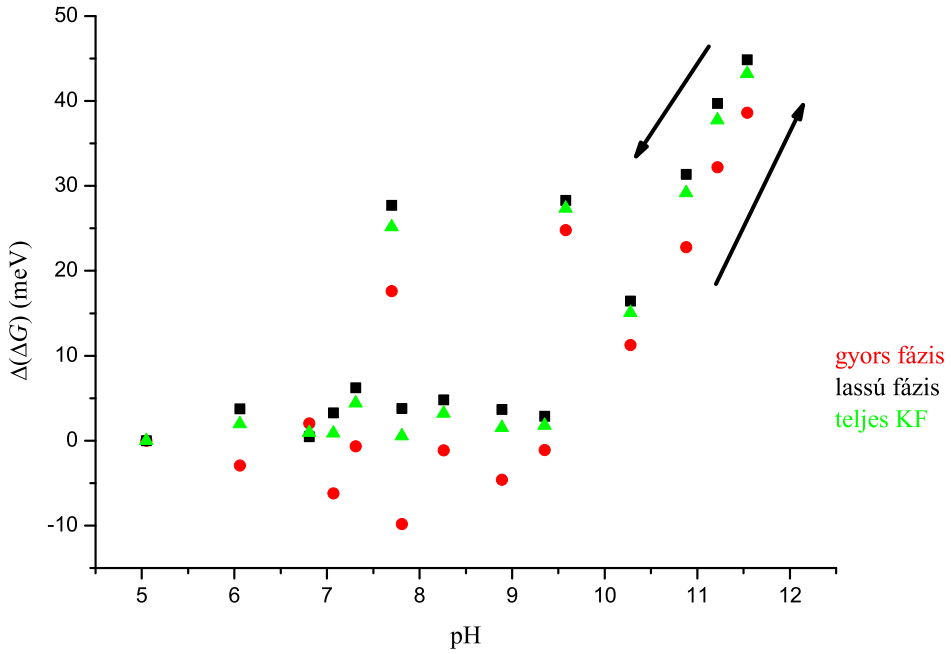
$$\mathrm{KF} = [\mathrm{RC}_{\mathrm{membrán}}] \cdot \mathrm{KF}_{\mathrm{membrán}} + [\mathrm{RC}_{\mathrm{micella}}] \cdot \mathrm{KF}_{\mathrm{micella}} \tag{5.7}$$

Az (5.5), (5.6) és az (5.7) alapján a következő összefüggést tudjuk felírni:

$$\frac{\mathrm{KF}}{[\mathrm{RC}]} = \mathrm{KF}_{\mathrm{micella}} \cdot \frac{[\mathrm{LDAO}]}{K + [\mathrm{LDAO}]} + \mathrm{KF}_{\mathrm{membrán}} \cdot \frac{K}{K + [\mathrm{LDAO}]} \tag{5.8}$$

Az (5.8) összefüggés egy dupla hiperbolikus függvényt definiál, amelyet a késleltetett fluoreszcencia gyors, és a lassú komponenseire illesztettük (5.13 ábra). A lassú komponensnél már 0,154% LDAO koncentrációnál a felére csökken a kezdeti integrált intenzitás. Ez a gyors komponens esetében kicsit nagyobb (0,32%) detergens koncentrációnál következik be. Más tekintetben a két komponens hasonló viselkedést mutatott a detergens titrálása során.

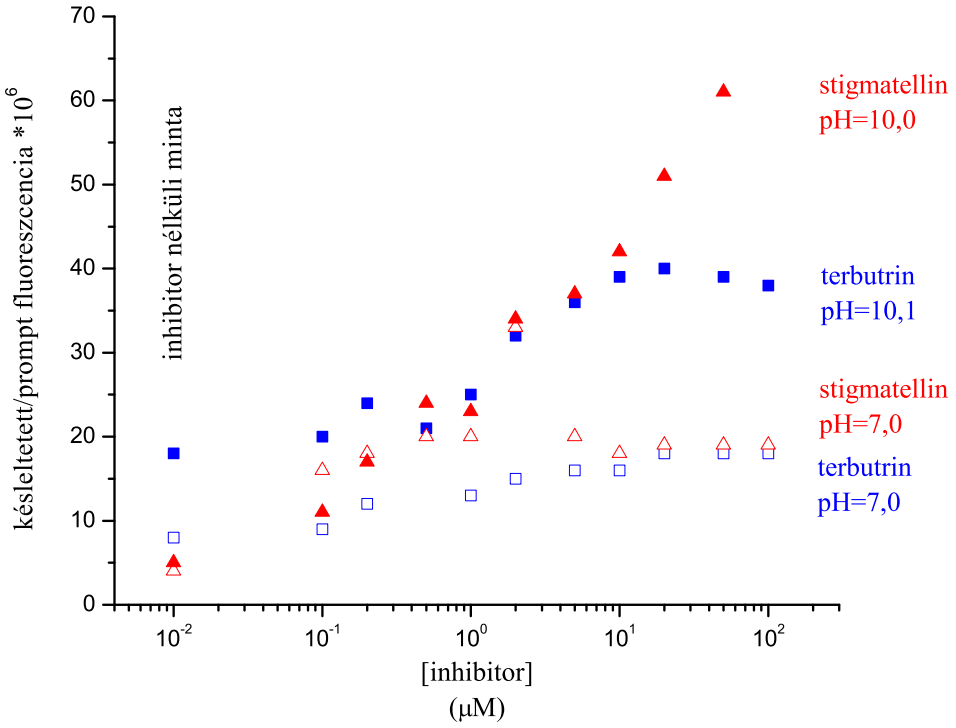
5.3.3. A kromatofora késleltetett fluoreszcenciájának pH-függése



5.14 ábra Kromatofora (CYCA1) késleltetett fluoreszcenciája alapján meghatározott relatív szabadenergia-változás a pH függvényében. A teljes késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitás alapján meghatározott relatív szabadenergia-változás értékek zölddel, a lassú komponensre meghatározott értékek feketével, míg a gyors komponensre meghatározott értékek piros színnel vannak jelölve. Mérési körülmények: RC-koncentráció 0,3 μM, 10 mM Trisz, 10 mM KCl, 1 μM stigmatellin és T = 299 K.

A pH növelésével a kromatofora késleltetett fluoreszcencia intenzitása növekedését tapasztaltuk. A különböző pH értékeknél felvett késleltetett fluoreszcencia kinetikákat két komponensre felbontva a kapott amplitúdó és élettartam értékek felhasználásával meghatároztuk az adott pH-hoz tartozó és pH = 5-re vonatkoztatott szabadenergia-értéket (5.14 ábra). A 10,5 feletti pH tartományban drasztikusan megnőtt a késleltetett fluoreszcencia intenzitása, mely részleges reverzibilitást mutatott. A két komponens hasonló viselkedést mutatott a pH titrálás során.

5.3.4. Inhibítor hatása a membrán-fragmentumba ágyazott reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciájára



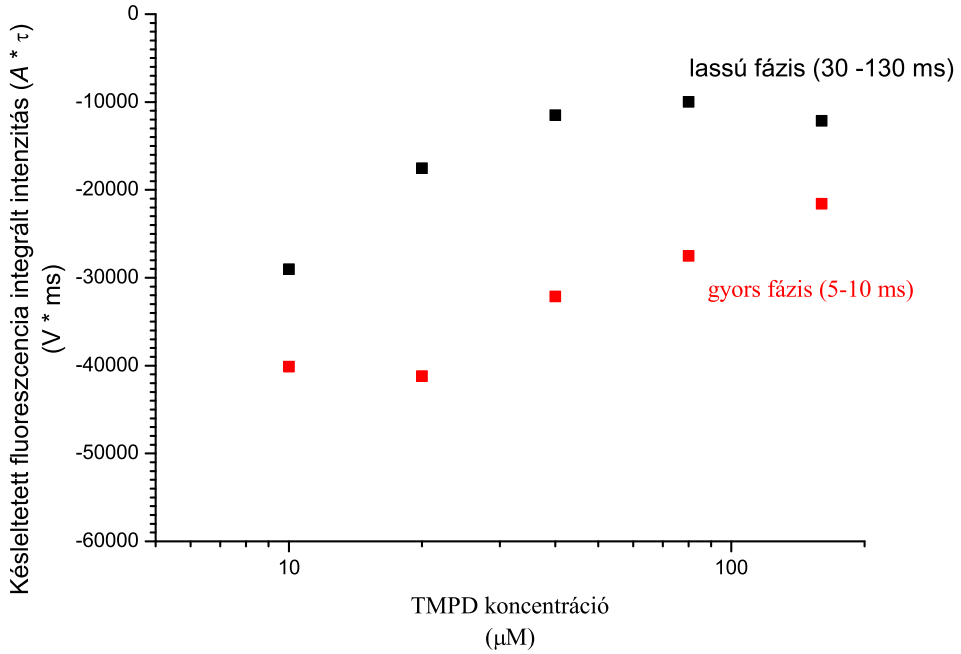
5.15 ábra Inhibítor hatása a membrán-fragmentumba ágyazott RC (CYCA1) késleltetett fluoreszcenciájára. A prompt fluoreszcencia intenzitással normált késleltetett fluoreszcencia intenzitást az inhibítorok (stigmatellin (piros) és terbutrin (kék)) koncentrációinak függvényében ábrázoltuk két különböző pH értéken (7,0 (üres szimbólumok) és 10,0 (telt szimbólumok)). Mérési körülmények: RC-koncentráció 0,22 μM, 10 mM Trisz, 100 mM NaCl, 5 μM valinomycin és T = 298 K.

A másodlagos kinon kötőhelyet inhibítorral gátolva a késleltetett fluoreszcencia növekedését tapasztaljuk, mivel ezzel megszüntetjük a $Q_A^- Q_B$ és a $Q_A Q_B^-$ állapotok közötti elektrontranszfert, és így P^* állapothoz képest kisebb csapdamélységgel (és ezért nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitással) rendelkező $P^+ Q_A^-$ állapot populációjának növekedését érjük el. Kromatofora esetében alacsony pH-nál (pH = 7,0) a stigmatellin és a terbutrin inhibítorok hasonló viselkedését figyeltük meg (5.15 ábra piros △ és kék □). Mindkét gátlószer hatása telítésbe vihető megfelelően magas koncentráció alkalmazása esetén.

Magas pH értéknél (pH = 10,0) ezzel szemben a két inhibítor eltérő viselkedést mutatott: a terbutrin hatását (5.15 ábra kék ■) újra telítésbe lehetett vinni, míg a stigmatellinnél (5.15 ábra piros ▲) ez nem volt elérhető még 50 μM inhibítor koncentrációnál sem. Detergensbe ágyazott RC-nál nem tapasztalható ekkora mértékű eltérés a stigmatellin hatásában a különböző pH értékeknél.

A jelenség hátterében nagy valószínűséggel a RC-nak a membrán-környezettel kialakított speciális kölcsönhatása állhat. Magas pH-n ez a kölcsönhatás deformálhatja a másodlagos kinon kötőhely geometriáját, amely egyes inhibítoroknál (jelen esetében a stigmatellinnél) a stabilizációt szolgáló hidrogénhíd kötések felszakadását eredményezheti, mely a kötési affinitás csökkenéséhez vezethet.

5.3.5. Külső elektrondonor hatása a kromatofora késleltetett fluoreszcenciájára



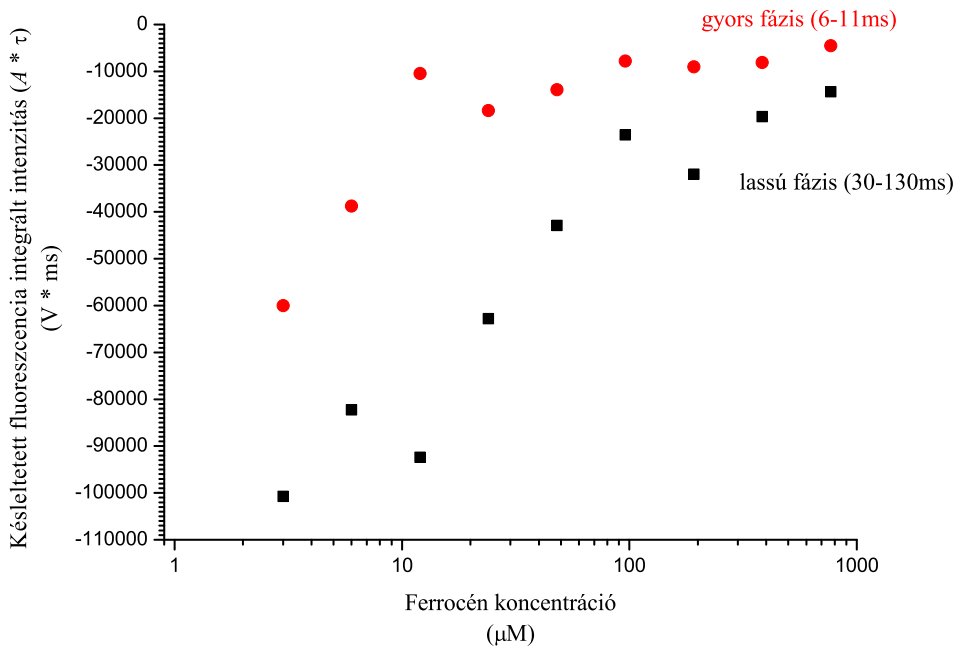
5.16 ábra Kromatofora (CYCA1) késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitásának függése a TMPD (dihidroklorid) elektron donor koncentrációjának függvényében. A késleltetett fluoreszcencia kinetikákat két komponensre bontottuk. A lassú (fekete) és a gyors (piros) komponens integrált intenzitás értékeit ábrázoltuk. Mérési körülmények: 10 mM Trisz, 10 mM KCl, 10 mM Caps, 2 μM stigmatellin és pH = 10,5. A késleltetett fluoreszcencia kinetikákat 128 jel átlagolásával kaptuk.

Természetes körülmények esetén a citokróm c_2 donor redukálja vissza az oxidált dimért (P^+-t) (2.6 ábra), így hozva azt ismételten gerjeszthető állapotba. Q_A aktív (másodlagos kinon inhibítorral gátolt) CYCA1 citokróm c_2 mentes izolált kromatofora esetében nincs jelen donor (citokróm c_2), így a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot csak a Q_A-ról történő visszreakció segítségével kerül alapállapotba (PQ_A). Megfelelő donort (ferrocén, illetve TMPD [dihidroklorid]) alkalmazva PQ_A^- állapotú zárt (töltésszétválasztásra nem képes) RC-okat

tudunk létrehozni. Ebben az esetben két folyamat fog versengeni egymással: az elsődleges kinonról való töltésrekombináció folyamata ($P^+Q_A^- \longrightarrow PQ_A$), és az oxidált dimér elektron donor által való visszaredukálódása ($P^+Q_A^- \longrightarrow PQ_A^-$). Növelve a donor koncentrációját, ismételt gerjesztés alkalmazása mellett, csökkenteni tudjuk a nyílt (töltésszétválasztásra alkalmas) RC-ok számát, mivel a gerjesztő lézerimpulzus ismétlésének ideje (1 s) sokkal kisebb, mint a PQ_A^- állapot élettartama (ez feltételezhetően $\gg$ 1 s). Kevesebb nyílt RC-ból gerjesztést követően kisebb létszámú $P^+Q_A^-$ populáció jön létre, így a RC által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia intenzitása is csökkenni fog. A következő egyszerű modellel lehet leírni ezeket a folyamatokat:

$$\begin{tikzcd} P^+Q_A^- \arrow[r, "k_d"'] \arrow[d, "k_v"] & PQ_A^- \\ PQ_A & \end{tikzcd}$$

k_v a visszreakció sebessége, míg k_d az elektron donálás (a donor koncentrációjával változtatható mértékű) sebessége.

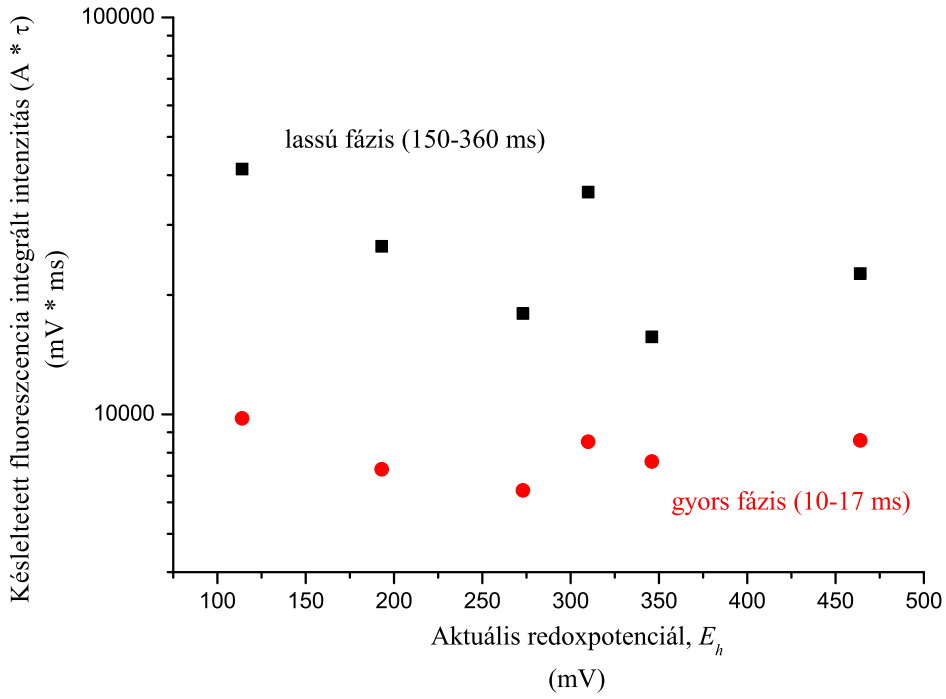


5.17 ábra Izolált kromatofora (CYCA1) késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitásának függése a ferrocén elektron donor koncentrációjának függvényében. A késleltetett fluoreszcencia kinetikákat két komponensre bontottuk. A lassú (fekete) és a gyors (piros) komponens integrált intenzitás értékeit ábrázoltuk. Mérési körülmények: 10 mM Trisz, 10 mM KCl, 10 mM Caps, 2 μM stigmatellin és pH = 10,76. A késleltetett fluoreszcencia kinetikákat 128 jel átlagolásával kaptuk.

A mért késleltetett fluoreszcenciát teljesen nem lehet eltüntetni egyik elektron donor (TMPD 5.16 ábra, ferrocén 5.17 ábra) esetében sem, mivel 128 jel átlagolása szükséges, és ez 128 s teljes mérési időt jelent. Ezen idő alatt a zárt RC-ok redukált kinonjai (PQ_A^-) véges valószínűséggel visszaoxidálódnak (PQ_A) valamilyen elektron akceptor hatására, és az így előálló RC-ok képessé válnak késleltetett fluoreszcencia kibocsátására. Növekvő donálási sebességgel (nagyobb elektron donor koncentráció esetén) a késleltetett fluoreszcencia intenzitása hiperbolikus függvény szerint változik. Mindkét elektron donorra (5.16 és 5.17 ábra) hasonló tendencia figyelhető meg, továbbá mindkét komponens (lassú és gyors) csökkenést mutat növekvő donor koncentráció mellett. A két fázis tehát nem mutat nyilvánvalóan eltérő viselkedést.

5.3.6. Külső redoxpotenciál hatása

Kromatoforán (CYCA1) redoxpotenciál titrálást hajtottunk végre a 100 - 450 mV tartományban (5.18 ábra). Amint az várható volt a RC kofaktorainak elektrokémiai tulajdonságaiból, a késleltetett fluoreszcencia nem változik specifikusan ebben a potenciál tartományban. A bakterioklorofill dimér még nem oxidálódik, és az elsődleges kinon sem redukálódik elektrokémiai úton. A két komponens viselkedése (gyors és lassú) nem mutat eltérést ebben a tartományban.

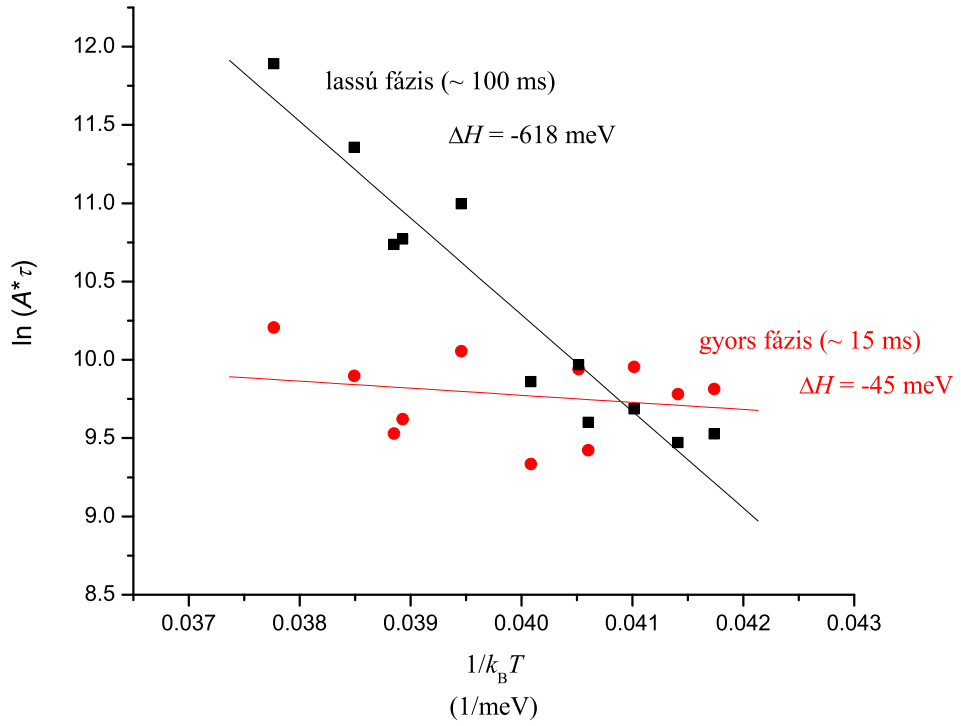


5.18 ábra Kromatofora (CYCA1) késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitása a külső redoxpotenciál függvényben (100-450 mV). Az aktuális redoxpotenciált aszkorbinsav és H_2O_2 segítségével állítottuk be. Mérési körülmények: 10 mM Trisz, 10 mM KCl, 10 mM Caps, 2,5 mM ferroCN, 2 μM stigmatellin és pH = 10,7. A késleltetett fluoreszcencia kinetikákat 128 jel átlagolásával kaptuk.

5.3.7. Hőmérsékletfüggés

A Q_A aktív izolált RC késleltetett fluoreszcenciája hőmérsékletfüggést mutat. A késleltetett fluoreszcencia intenzitásának hőmérsékletfüggéséből meghatározható a $P^*Q_A \longrightarrow P^+Q_A^-$ töltésszétválasztás fontos termodinamikai jellemzői, az entalpia- és az entrópia-változása. Az ún. van't Hoff-féle ábrázolás (a késleltetett fluoreszcencia amplitúdójának, illetve integrált intenzitásának logaritmusa az $\frac{1}{k_B T}$ függvényében) esetén egy egyenest kapunk, melynek meredeksége megadja a folyamathoz tartozó (hőmérséklettől független) entalpiaváltozás (ΔH_A°) értékét. Ez pH = 10,0-nál *Rhodobacter sphaeroides* R-26 vadtípusú törzs esetében -861 ± 40 meV [116, 104, 117].

Q_A aktív kromatofora esetében szintén hőmérsékletfüggést figyeltünk meg a RC eredetű késleltetett fluoreszcenciánál. A két komponens esetében (gyors és lassú) viszont eltérő viselkedést tapasztaltunk. A lassú komponens erős hőmérsékletfüggést mutatott a fiziológiás hőmérséklet tartományban (hasonlóan az izolált RC-hoz), és a van't Hoff-féle ábrázolás (5.19 ábra fekete) segítségével az entalpia-változás értékére -618 meV-ot kaptunk erre a komponensre.



5.19 ábra Kromatofora (CYCA1) által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia van't Hoff-féle ábrázolása, fiziológiás hőmérsékleti tartományban (5,6 - 34,9 °C), pH = 10,5-nél. Az amplitúdó helyett az integrált intenzitásokat vettük a gyors és a lassú komponens esetében, továbbá ezt normáltuk a fotoaktív RC-ok koncentrációjára (605 nm-nél mért fényindukált abszorpcióváltozásból (ΔOD) határoztuk meg). Mérési körülmények: 10 mM Trisz, 100 mM KCl, 10 mM Caps és 2 μM stigmatellin.

A lassú komponens a $P^+Q_A^-$ állapotból származtatható, és viselkedése azonosnak tekinthető az izolált RC esetében már leírt komponensével. A $P^* \longrightarrow P^+Q_A^-$ töltésstabilizáció

folyamata nagy entalpia-változással jár együtt, mely gyakorlatilag irreverzibilissé teszi ezt a termodinamikai lépést.

Figyelembe véve, hogy a késleltetett fluoreszcencia gyors és a lassú komponenseinek integrált intenzitásai közel azonosak, feltehetjük, hogy a két komponens által meghatározott állapotok és a P^* állapot közötti szabadenergia-különbség nagyon közel van egymáshoz. A lassú komponenssel szemben a gyors komponens nagyon csekély hőmérsékletfüggést mutat ugyanezen hőmérsékleti tartományban, és az entalpia-változásra nagyon kicsi (-45 meV) értéket kaptunk (5.19 ábra). Kijelenthetjük, hogy a gyors komponensnek megfelelő termodinamikai folyamatot, szemben az elsődleges kinonon történő töltésstabilizációval, nagy entrópia-változás jellemzi.

5.3.8. A kísérleti eredmények elemzése

A természetes környezetébe (membránba) ágyazott RC késleltetett fluoreszcenciája több érdekes tulajdonságot (illetve markáns eltérést) mutat a detergensbe feloldott fehérje késleltetett fluoreszcenciájával összehasonlítva. Ezek közül a két legjellemzőbbet választjuk ki, és az eltérés okait elemezzük.

Detergensbe és membránba ágyazott reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciáinak összehasonlítása

Az ugyanakkora RC mennyiségre vonatkoztatott késleltetett fluoreszcencia intenzitása körülbelül két nagyságrenddel nagyobb kromatoforában, mint detergens oldatban. Ennek oka abban keresendő, hogy a kromatofora membránjába ágyazott RC egyrészt más környezetben van, másrészt más kölcsönhatásokban vesz részt, mint a detergenssel oldatba vitt (feloldott) RC. Micelláris oldatban a fehérje a körülötte lazán és kevéssé struktúrált módon elhelyezkedő detergensekkel többnyire csak gyenge kölcsönhatást alakít ki. Ezzel szemben a membránfrakciókban meghatározó jelentőségű lehet a membrán lipidjeivel való szorosabb és specifikus kölcsönhatás, amelynek eredményeképp jelentősen eltolódhat a primér kinon középponti redoxpotenciálja. Ha az eltolódás a negatívabb potenciálok irányában történik, akkor csökken a P^* és a $P^+Q_A^-$ szintek szabadenergiái közti különbség, azaz (a Boltzmann-faktorral meghatározott mértékben) növekszik a megfigyelt késleltetett fluoreszcencia intenzitása. Mivel szobahőmérsékleten 60 meV szintkülönbség 1 nagyságrend intenzitás-változásnak felel meg, ezért a tapasztalt két nagyságrendű intenzitás-növekedés a késleltetett fluoreszcenciában a töltés-szeparált állapot 120 meV szabadenergia csökkenésével egyenértékű. Ez természetesen csak akkor igaz, ha a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának emelkedését kizárólag a $P^+Q_A^-$ energiaszintjének csökkenésével magyarázzuk.

Ez az elképzelés nem áll messze az igazságtól, mert egyrészt saját méréseink, másrészt az irodalomban jól ismert jelenségek és adatok is bizonyítékul szolgálnak. Kimutattuk ebben a disszertációban, hogy számos, Q_A körüli aminosav mutációja jelentősen el tudja tolni a Q_A/Q_A^- redox pár középponti potenciálját, amely a megfigyelt késleltetett fluoreszcencia nagymértékű (exponenciálisan emelkedő) változását váltja ki. Hasonló effektust figyeltünk meg a kardiolipin és a RC kölcsönhatásában, amely a membránbeli természetes viszonyok nagyon közeli modelljének tekinthető. Nem csupán a késleltetett fluoreszcencia mérések, hanem a közvetlen redox mérések is bizonyító erejűek: míg detergenssel izolált RC-ban pH 8-nál a Q_A/Q_A^- középponti redoxpotenciálra optikai vizsgálatokból +10 mV körüli értéket kaptak [69], addig ugyanez a mennyiség kromatoforában -75 mV-nak adódott ESR mérések alapján [10]. Több hasonló vizsgálat is alátámasztja azt az elképzelést, hogy természetes membránba ágyazva a Q_A/Q_A^- redox pár középponti potenciálja 100 mV értékkel is negatívabb lehet a detergens oldatbeli értékéhez képest. Ezekből azt a következtetést vonhatjuk

le, hogy a késleltetett fluoreszcencia intenzitásában megfigyelt változás meghatározó effektusa a természetes membrán lipidjei és a RC redoxcentrumai közötti energetikai csatolás.

A fent említett kölcsönhatás domináns, de valószínüleg nem kizárólagos a tapasztalt intenzitás-növekedés értelmezésében. A kromatoforát, szemben az izolált RC-mal, ugyanis nem csupán a RC-membrán-lipid kölcsönhatás jellemzi, hanem a RC-nak az antenna-rendszerrel kialakítható szoros kapcsolata is. Míg izolált RC-ban a késleltetett fluoreszcencia kizárólag a dimérből eredeztethető, addig kromatoforában fennáll annak a lehetősége is, hogy a visszreakcióval előállt P^* állapot nem dezaktiválódik késleltetett fluoreszcencia foton alakjában, hanem energia-(exciton)vándorlás révén az antenna-rendszerben delokalizálódik. A fotont valamelyik antenna-pigment fogja emittálni, de ennek hatásfoka már nem szükségképp azonos a dimér fluoreszcencia hatásfokával (hasonló jelenség a szenzibilizált fluoreszcencia). Láttuk, hogy a RC-antenna kapcsolat lazulását, illetve a teljes felszakadását, amelyet az ikerionikus detergens (LDAO) fokozatos hozzáadásával értünk el, a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának drasztikus (1-2 nagyságrendű) csökkenése, és a prompt fluoreszcencia mérsékelt (2-3-szoros) emelkedése (nem közölt adat) kíséri. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a fluoreszcencia hatásfoka attól függően különbözik, hogy az elektron gerjesztett állapot (exciton) a RC dimérben ($4 \cdot 10^{-4}$, [102]) vagy az antenna egyik bakterioklorofilljában dezaktiválódik. Az LDAO titráláson alapuló előzetes méréseink inkább azt valószínűsítik, hogy az antennában kisebb hatásfokú a fluoreszcencia emissziója, mint a RC dimérben. A kiértéklést megnehezíti az a tény, hogy az LDAO detergens nem csak szétválasztja és kioldja a membránból a fehérjéket, hanem a (RC és antenna) fehérjékhez kötött pigmenteket is módosíthatja, például megváltoztatja a fluoreszcencia hatásfokát. Ezeket az összetett hatásokat külön kell vizsgálni és értékelni, mert ezekre a disszertációban nem tudtunk kitérni.

A RC-nak az antenna-rendszerrel való kapcsolata egy másik (kisebbségi) hatást is kiválthat. Az antenna (elnevezéséhez illően) megsokszorozza a fotofizikai rendszer fénybegyűjtőképességet, ezért, ha nem volt teljesen telítési a fényfelvillanás az izolált RC-ban, akkor a membránban az antenna gondoskodik a RC teljes fénytelítéséről. Ez természetesen a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának emelkedésével jár együtt. Az effektus számottevő lehet, ha a késleltetett fluoreszcenciát a fénytelítési görbe lineáris (és nem telítési) szakaszán vesszük fel. Erre akkor van szükség, amikor (a szabadenergia abszolút értékének kiszámításához) a késleltetett fluoreszcenciát a prompt fluoreszcencia intenzitásával kell összhasonlítani. Ekkor a gerjesztés/megfigyelés (input/output) több nagyságrenden átívelő linearitását használjuk ki a prompt fluoreszcencia meghatározható mértékű gyengítésére (lásd az Anyagok és Módszerek c. fejezetet).

Új komponens a kromatofora késleltetett fluoreszcencia kinetikájában

A kromatofora késleltetett fluoreszcencia kinetikájában megjelenik egy gyors (10 ms körüli élettartamú) komponens, amelynek nincs megfelelője sem a detergenssel feloldott (izolált) RC késleltetett fluoreszcenciájában, sem a hasonló körülmények között felvett és az oxidált dimérre jellemző abszorpció változásában. A megfigyelés magyarázatára a késleltetett fluoreszcencia keletkezésének alapelvéig megyünk vissza.

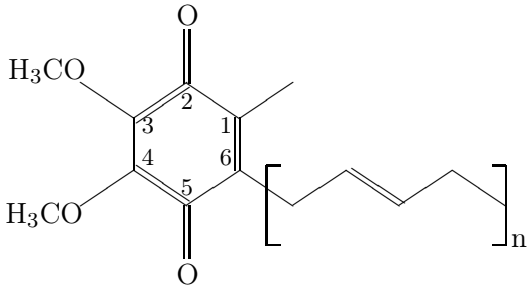
A késleltetett fluoreszcencia a gerjesztett állapotú dimerből (P^*) származik (az emisszió maximuma 920 nm-nél van) és intenzitása a prompt fluoreszcenciához viszonyítva 8-9 nagyságrenddel kisebb. A P^*-hoz képest az átmeneti redox állapotok nagyon mélyen fekszenek (lásd az árok ΔG mélységeit a különböző mutánsokra az előző fejezetben), ezért innen csak szivárgással (azaz nagyon kis valószínűséggel) folyhat visszafelé elektron-áram. A késleltetett fluoreszcencia intenzitása tehát kicsiny a kis arányban visszafelé irányuló elekt-

rontranszfer miatt, és kinetikája visszatükrözi az előre irányuló elektrontranszfer egymást követő lépéseit [116]. Amennyiben az elektron útját Q_A és Q_B között gátoljuk, akkor a milliszekundumos időtartományban egyetlen (itt "lassú"-nak nevezett és 100 ms körüli időállandójú) fázis (lecsengés) mutatkozik mind az abszorpcióváltozásban, mind a késleltetett fluoreszcenciában, amely a $P^+Q_A^- \longrightarrow PQ_A$ visszreakciót tükrözi. Az ennél szignifikánsan gyorsabb ($\approx$ 10 ms életidejű) komponens megjelenése a késleltetett fluoreszcencia lecsengésében egy újabb átmeneti redox állapot létezésére utal, amely azonban az abszorpcióváltozásban "csendes", azaz nem jelentkezik külön kinetikai komponensként. Ez legegyszerűbben úgy értelmezhető, hogy ez az átmeneti állapot a $P^+Q_A^-$ töltésszeparált állapot és fehérje-környezetének még nem relaxált formája, amelynek meglehetősen hosszú időre van szüksége az egyensúly visszanyerésére. Mivel mind a relaxálatlan, mind a relaxált állapot ugyanahhoz a redox állapothoz tartozik, ezért közöttük abszorpcióban nem tudunk különbséget tenni, azaz a relaxálatlan állapot "csendes". A késleltetett fluoreszcenciája alapján azonban megkülönböztethető a két állapot.

A kromatoforában megfigyelt késleltetett fluoreszcencia gyors és lassú komponensei számos kezelés hatására hasonlóan viselkednek. A komponensek kialakulásáért felelős állapotok szabadenergiáinak pH-függése nagy hasonlatosságot mutat, akárcsak az LDAO detergenssel való kölcsönhatásuk, az aktuális redoxpotenciáltól való függésük, vagy a külső elektron donorokkal (ferrocen, TMPD) szembeni viselkedésük. Mindezek a hasonlóságok azt jelzik, hogy közeli és megegyező alaptulajdonságú állapotokhoz köthető a két komponens. Jelentősebb eltérést a hőmérséklet változtatásával szembeni viselkedés mutatott. A van't Hoff ábrázolások egyértelműen jelezték, hogy két teljesen eltérő entalpia- és entrópia-változás jellemzi a $P^+Q_A^- \longrightarrow P^*$ folyamatot a gyors és a lassú komponensek esetében. A nem relaxált $P^+Q_A^-$ állapotból nagyon kicsiny entalpia-változás ($\Delta H \approx 45$ meV) vezet a P^* elektron gerjesztett állapot (vissza-, illetve be-)népesítéséhez, míg ugyanez a folyamat a relaxált $P^+Q_A^-$ állapotból $\Delta H \approx 620$ meV entalpia-változást igényel. Mivel mindkét szint gyakorlatilag ugyanabban a mélységben van, azaz körülbelül ugyanakkora a szabadenergia-változás, ezért az entalpia-változásban megmutatkozó különbséget az entrópia-változás kompenzálja. Más szavakkal megfogalmazva azt mondhatjuk, hogy a nem relaxált állapotból az entrópia, míg a relaxált állapotból az entalpia működteti a $P^+Q_A^- \longrightarrow P^*$ folyamatot. Ez a termodinamikai értelmezés közel állhat a molekuláris szinten leírható valósághoz, hiszen a nem relaxált állapotot a relaxálttól éppen az különbözteti meg, hogy a $P^+Q_A^-$ állapotnak a környezettel együtt értelmezett entrópiája (rendezetlensége) lényegesen nagyobb.

5.4. Az elsődleges kinon redoxpotenciáljának meghatározása számítógépes szimuláció segítségével vadtípusú és mutáns reakciócentrumokban

A számítógépes szimulációk során a Stowell és mtsai. által megadott 1AIJ struktúrát [35] alkalmaztuk kiindulási szerkezetként. A kristályszerkezetben alkalmazott nomenklatúrával való könnyebb összevethetőség érdekében a kinonmolekula atomjainak az ott megadott számozási rendjét követtük (3,4-dimetoxi-1-metil-6-dekaizoprenil -2,5-benzokinon) a konvencionális (2,3-dimetoxi-5-metil-6-dekaizoprenil -1,4-benzokinon) helyett (5.20 ábra).



5.20 ábra Az ubikinonmolekula kémiai felépítése. A számítógépes szimulációk során 4 izoprén egységgel rendelkező ubikinonmolekulát használtunk. A kinongyűrű szénatomjainak számozása megegyezik a Stowell-féle 1AIJ [35] struktúrában alkalmazott konvencióval.

Az 1AIJ PDB azonosítójú szerkezetből a három fehérjealegységen (H,M,L), és az elsődleges kinonmolekulán kívül minden egyéb nem fehérje természetű kofaktorokat, lipidmolekulákat, szerkezeti vízmolekulákat, és a nem hem típusú vasatomot eltávolítottunk.

Warncke és mtsai. megvizsgálták, hogy milyen hatással van az izoprén lánc hossza az elsődleges, és a másodlagos kinon kötési affinitására [61]. Azt találták, hogy a Q_A kötőhely esetében ubikinon-0-tól (amely nem rendelkezik izoprén lánccal, $\Delta G_{\text{kötési}}(Q_A)$ = -6,84 kcal/mol) ubikinon-4-ig ($\Delta G_{\text{kötési}}(Q_A)$ = -13,1 kcal/mol) növekszik a kötési szabadenergia, míg efölött nagyjából állandó értéket vesz fel, és nem függ az izoprén egységek számától a továbbiakban. Ezen eredmények figyelembevételével, valamint a könnyebb kezelhetőség miatt (kisebb atomszám rövidebb futási időt jelent) a natív ubikinon-10 helyett ubikinon-4-et használtunk elsődleges kinonmolekulaként. A negyedik izoprén egység utáni atomokat töröltük a szerkezetből.

A fehérje adatbank szerkezeti fájljában nincsenek hidrogénatomok, így azokat nekünk kell a különböző molekulákhoz hozzáadnunk. A három fehérjealegység esetében ezzel nincs gondunk, mivel a szimulációk során felhasznált erőtér készletek (force field) aminosavakra tartalmazzák az ehhez megfelelő paramétereket. A kinonmolekula esetében a hidrogéneket a Dundee PRODRG2 szerver (`http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/`) [142] segítségével adtuk a meglévő nehéz atomokhoz.

Az ubikinon-4 parciális atomi töltéseit gázfázisban a MOPAC 93.00 [143] programcsomagban implementált AM1 szemiempirikus kvantumkémiai szinten, Mulliken populációanalízis segítségével határoztuk meg a kinon, és az egyszeres negatív töltéssel rendelkező szemikinon állapotokra. A későbbi szimulációk egyesített atommodellt alkalmaznak, így ezeket az atomi parciális töltéseket átszámoltuk a megfelelő atomcsoportokra (5.2 és 5.3 táblázat).

Fejrész			
PDB azonosító	**Atomcsoport**	**Kinon töltés**	**Szemikinon töltés**
C1	C	-0,13	-0,18
C1M	CH_3	0,12	0,16
C2	C	0,28	0,23
O2	O	-0,26	-0,54
C3	C	-0,02	-0,06
O3	O	-0,25	-0,13
C3M	CH_3	0,20	0,12
C4	C	0,01	0,04
O4	O	-0,22	-0,14
C4M	CH_3	0,20	0,13
C5	C	0,27	0,24
O5	O	-0,24	-0,53
C6	C	-0,10	-0,18

5.2 táblázat Mulliken populáció-analízissel meghatározott parciális atomi töltések értékei az egyesített atommodell atomcsoportjaira átszámolva kinon és szemikinon eseteiben. A meghatározás gázfázisban történt AM1 szemiempirikus kvantumkémiai közelítéssel (MOPAC 93.00). Az adatok a kinon fejrészére vonatkoznak.

Hidrokarbon izoprén lánc			
PDB azonosító	**Atomcsoport**	**Kinon töltés**	**Szemikinon töltés**
C7	CH_2	0,15	0,11
C8	CH	-0,09	-0,02
C9	C	-0,09	-0,17
C10	CH_3	0,09	0,08
C11	CH_2	0,06	0,06
C12	CH_2	0,06	0,03
C13	CH	-0,06	-0,02
C14	C	-0,13	-0,16
C15	CH_3	0,07	0,06
C16	CH_2	0,06	0,06
C17	CH_2	0,06	0,05
C18	CH	-0,06	-0,04
C19	C	-0,13	-0,15
C20	CH_3	0,07	0,06
C21	CH_2	0,06	0,06
C22	CH_2	0,06	0,06
C23	CH	-0,07	-0,05
C24	C	-0,13	-0,14
C25	CH_3	0,07	0,07
C26	CH_3	0,07	0,07

5.3 táblázat Mulliken populáció-analízissel meghatározott parciális atomi töltések értékei az egyesített atommodell atomcsoportjaira átszámolva kinon és szemikinon eseteiben. A meghatározás gázfázisban történt AM1 szemiempirikus kvantumkémiai közelítéssel (MOPAC 93.00). Az adatok a kinon hidrokarbon izoprén láncra vonatkoznak.

Az egyszeres negatív töltés főként a kinon fejrészén oszlik el, és nagyon csekély változást eredményez az izoprén lánc töltöttségében (5.2 és 5.3 táblázat). A két karbonil oxigénen (O2 és O5) szimmetrikusan jelenik meg a többlet töltés. A szimulációk során az aszimmetrikus töltéseloszlás lehetőségét is megvizsgáltuk oly módon, hogy az egyik vagy a másik karbonil oxigénre átcsoportosítottuk a többlet negatív töltést (elvontuk a másik karbonil oxigénről).

A vadtípuson kívül 5 mutáns RC-t is modelleztünk: M265IV, M265IS, M265IT, M218MA és M218MG. A mutációkat a PyMOL v0.99 (`http://pymol.sourceforge.net/`) [144] molekulaszerkesztő és megjelenítő programcsomag mutagenézis moduljával készítettük el. A mutáns RC-ok így a vadtípussal ellentétben nem voltak optimalizálva.

Kétféle megközelítést alkalmaztunk az ubikinon-4 kinonmolekula redoxpotenciáljának meghatározásához a Q_A kötőhelyen. Az első megközelítésnek a következő termodinamikai ciklus az alapja:

$$\begin{tikzcd}
\mathbf{Q} \arrow[r, "eE_{Q/Q^-}"] \arrow[d, "\Delta G^{Q_A}_{\text{kötési}}"'] & \mathbf{Q}^- \arrow[d, "\Delta G^{Q_A^-}_{\text{kötési}}"] \\
\mathbf{Q}_A \arrow[r, "eE_{Q_A/Q_A^-}"] & \mathbf{Q}_A^-
\end{tikzcd}$$

Q és Q^- jelöli a kinon oxidált, illetve redukált (szemikinon) állapotát az oldószerben. E_{Q/Q^-} a kinon középponti redoxpotenciálja oldószerben, melyet Zhu és mtsai. -145 mV értékben határoztak meg pH = 7,0-nál víz oldószerre [145]. Q_A és Q_A^- a kinon oxidált és redukált állapota az elsődleges kinon kötőhelyen a RC-ban. E_{Q_A/Q_A^-} a kinon redoxpotenciálja a Q_A kötőhelyen RC-ban, mely kísérleti úton 30 mV-nak adódott [64], illetve korábbi méréssel 10 mV-nak pH = 7,0-nál [146]. $\Delta G^{Q_A}_{\text{kötési}}$ a kinon, míg $\Delta G^{Q_A^-}_{\text{kötési}}$ a szemikinon kötési szabadenergiája az elsődleges kinon kötőhelyére RC-fehérjében. Az ubikinon-4 kötési szabadenergiája a Q_A kötőhelyre kísérleti adatok alapján -13,1 kcal/mol [61].

A fenti termodinamikai ciklust felhasználva a kinon középponti redoxpotenciálja a különböző RC-ok Q_A kötőhelyén kiszámolható, ha meghatározzuk a kinon és a szemikinon kötési szabadenergiáját, és felhasználjuk hogy vízben a kinon középponti redoxpotenciálja E_{Q/Q^-} = -145 mV [145]:

$$eE_{Q/Q^-} - eE_{Q_A/Q_A^-} = \Delta G^{Q_A}_{\text{kötési}} - \Delta G^{Q_A^-}_{\text{kötési}} \tag{5.9}$$

Itt e az elektron töltése, és E-t mV-ban, ΔG-t meV-ban mérjük. Ebből következően:

$$E_{Q_A/Q_A^-} = E_{Q/Q^-} - (\Delta G^{Q_A}_{\text{kötési}} - \Delta G^{Q_A^-}_{\text{kötési}})/e \tag{5.10}$$

A relatív kötési szabadenergiák meghatározását két különböző módszerrel végeztük: (1) lineáris kölcsönhatási energiák módszerével (Linear Interaction Energy, LIE) és (2) dokkolással. A módszerek leírását az "Anyagok és módszerek" c. fejezet tartalmazza.

A második megközelítésben a szabadenergia perturbáció (Free Energy Perturbation, FEP) módszert használtuk fel, arra hogy az ubikinon-4 molekula redox állapot változását modellezzük vadtípusú és mutáns RC-fehérjékben.

5.4.1. Kötési szabadenergiák meghatározása LIE módszerrel

Az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtuk a módszer elvi hátterét, itt a gyakorlati megvalósítás néhány részletére szeretnénk kitérni az eredmények bemutatása előtt.

A kötési szabadenergia meghatározásához szükséges poláris (elektrosztatikus), és nem poláris (nem elektrosztatikus, jelen esetben van der Waals) kölcsönhatások nagyságát MD szimulációk segítségével tudjuk meghatározni. Ehhez mi az Åqvist és mtsai. által kifejlesztett Q-Package (`http://xray.bmc.uu.se/~aqwww/q/default.html`) [147] MD szoftvercsomag 5-ös verzióját használtuk FreeBSD (`http://www.freebsd.org`) operációs rendszeren.

A MD szimulációk során a Gromos87 [122] erőtér paraméterkészletet (force field) alkalmaztuk, az CH_n alifás csoportokat pedig egyesített atomokként kezeltük. Az ubikinon-4 molekulához, mivel az nem fehérje, úgynevezett könyvtár fájlt kellett elkészíteni, mely tartalmazza az egyesített atomtípus megfeleltetéseket (5.4 táblázat), az atomok kötéseit, valamint a töltéseket (melyet korábban határoztunk meg kinon/szemikinon redox állapotra), illetve töltéscsoportokat.

PDB azonosító	**Gromos87 egyesített atomtípus**	**PDB azonosító**	**Gromos87 egyesített atomtípus**
C1	C.ar	C11	C.3H2
C1M	C.3H3	C12	C.3H2
C2	C.ar	C13	C.ar.6H
O2	O.2	C14	C.ar
C3	C.ar	C15	C.3H3
O3	O.3s	C16	C.3H2
C3M	C.3H3	C17	C.3H2
C4	C.ar	C18	C.ar.6H
O4	O.3s	C19	C.ar
C4M	C.3H3	C20	C.3H3
C5	C.ar	C21	C.3H2
O5	O.2	C22	C.3H2
C6	C.ar	C23	C.ar.6H
C7	C.3H2	C24	C.ar
C8	C.ar.6H	C25	C.3H3
C9	C.ar	C26	C.3H3
C10	C.3H3		

5.4 táblázat Az ubikinon-4 molekula atomjainak megfeleltetése a Gromos87 erőtér paraméterkészlet egyesített atomtípusaival.

A szimulációkban aktívan (mozgásuk engedélyezett volt) a kinon O2-es karbonil oxigénjétől 25 Å távolságon belüli aminosavak vettek részt. A fehérje ezen kívüli részét 200 $\frac{kcal}{mol \cdot \AA^2}$ harmonikus erőállandóval a kristályszerkezeti pozíciójába befagyasztottuk.

Rabenstein és mtsai. eredményei alapján [148] a Glu^{L104} és a Glu^{L212} reziduumok alap (Q_AQ_B) és egyszeresen redukált ($Q_A^{\cdot -}Q_B$) állapotban protonáltak pH = 7,5-nél. A Gromos87 erőtér paraméterkészlet lehetőséget ad a glutaminsav és aszparginsav esetében a protonált forma használatára, így ennél a két reziduumnál ezt alkalmaztuk is. Ezen kívül az O2-es karbonil oxigéntől 20 Å távolságon belül elhelyezkedő aszparaginsav, glutaminsav, arginin és lizin reziduumokat ionikusan "bekapcsoltuk" (5.5 táblázat).

Pozitív töltésűek		Negatív töltésűek	
Reziduum neve	**O2-től való távolság**	**Reziduum neve**	**O2-től való távolság**
Lys^{L8}	17,88 Å	Glu^{L6}	16,47 Å
Arg^{L103}	16,54 Å	Asp^{L213}	20,08 Å
Arg^{L231}	16,50 Å	Glu^{M232}	12,84 Å
Arg^{M228}	14,89 Å	Asn^{M240}	18,78 Å
Arg^{M233}	17,05 Å	Glu^{M246}	14,64 Å
Arg^{M241}	15,68 Å	Glu^{M263}	13,92 Å
Arg^{M247}	15,23 Å	Glu^{H34}	16,24 Å
Arg^{M253}	15,13 Å	Glu^{H38}	14,08 Å
Arg^{M267}	15,38 Å	Glu^{H122}	18,14 Å
Lys^{H62}	17,01 Å	Glu^{H173}	17,52 Å
Arg^{H117}	15,95 Å	Glu^{H230}	19,68 Å
Arg^{H177}	16,62 Å	Aps^{H231}	16,93 Å

5.5 táblázat A szimulációk során ionikusan bekapcsolt reziduumok és azok távolságai az elsődleges kinon O2-es karbonil oxigénjétől az 1AIJ struktúra alapján.

A 25 Å-ön belüli teret feltöltöttük vízmolekulákkal ("rigid" SPC [simple-point-charge] vízmolekula modell [149]) gömbszimmetrikusan rácsalakban a meglévő szerkezeti nehézatomok kihagyásával a Q-Package szoftvercsomag Qprep moduljának segítségével a fehérjén belüli MD szimulációk esetében. Ez a vadtípusnál 578 darab, az M265-ös mutánsoknál 580 darab, míg az M218-as muténsoknál 591 darab SPC vízmolekulát hozzáadását jelentetett. A legújabb röntgendiffrakciós szerkezetek [150], már nagyobb mennyiségű szerkezeti vízmolekulát (például az 2HG3 jelű 452 darabot) tartalmaznak, így az általunk alkalmazott közelítés nem változtatja meg túl drasztikusan a kinonmolekula környezetét. Az oldószerben (SPC víz) történt futtatások alkalmával magát a kinonmolekulát vettük körül 25 Å sugarú gömb alakú térrészben vízmolekulákkal. Az ionikusan "bekapcsolt" reziduumok helyén pedig Na^+, valamint Cl^- ionokat helyeztünk el, hogy a fehérjén belüli szimulációhoz hasonló elektrosztatikus körülményeket alakítsunk ki.

A módszer egyik fontos követelménye, hogy az oxidált és a redukált állapot esetében is meg kell tartani a teljes rendszer neutrális állapotát. Szemikinon szimulációk során ezért az O2-től nagy távolságban lévő glutaminsav (Glu^{H230}) reziduumot ionikusan "kikapcsoltuk", illetve oldószerben történt MD szimulációk során eggyel kevesebb Cl^- iont alkalmaztunk.

A fehérjén belüli MD szimulációt megelőzően ún. relaxációs és egyensúlyi futtatásokat végeztünk. Először alacsony hőmérsékleten (1 K) erős hőmérsékleti csatolással értük el (0,2 fs relaxációs idővel hőtartályhoz csatoljuk a rendszert) a kiindulási struktúra relaxációját (ez egyfajta geometriai optimalizációnak is tekinthető). Ezt követően a rendszert fokozatosan 1 K-ről 300 K-rel melegítettük fel (3 lépésben: 50 K-en 6 ps-ig, 150 K-en 4 ps-ig és 300 K 10,5 ps-ig), a hőmérsékleti csatolás folyamatos csökkentése mellett, a hőmérsékleti egyensúly beállás érdekében.

Ezután következett a tényleges MD szimuláció: 5-ször 50000 darab 1 fs-os szimulációs lépéssel 300 K állandó hőmérsékleten. Minden szimuláció az elsőt kivéve az előző szimuláció befejező koordinátáit és sebességeit használta kiindulási adatként. Az első szimuláció esetében a kiindulási atomi sebességeket a Maxwell-Boltzmann-eloszlás alapján határoztuk meg 300 K-en. A nemkötő kölcsönhatások kezelésére 10 Å határtávolságot (cutoff) hagytunk az oldott-oldott, oldószer-oldószer, és oldott-oldószer atomok között. Az oldószer atomjaira polarizációs megszorítást alkalmaztunk (az erőállandó a polarizációs megszorításhoz:

20,0 $\frac{kcal}{mol \cdot rad^2}$). Az elektrosztatikus kölcsönhatásokat a "lokális reakció tér" eljárással (Local Reaction Field, LRF) kezeltük [151]. A kötéstávolságok és az atom-atom távolságok megszorítására a SHAKE algoritmust [152] alkalmazta a programcsomag.

Az oldószerben történt MD szimulációt hasonló paraméterekkel végeztük, de két fontos különbséget tettünk: (1) a szimuláció hossza 5 × 50000 darab 1,5 fs-os lépés volt, (2) és a kinonmolekula és a hozzáadott ionok pozícióját befagyasztottuk.

A kötési szabadenergia meghatározásához a LIE módszer alkalmazása esetén szükségünk van a ligandum (esetünkben ubikinon-4 molekula) és a környezete közötti elektrosztatikus, valamint a nemelektrosztatikus (van der Waals kölcsönhatás, melyet a Lenard-Jones potenciállal lehet közelíteni) kölcsönhatási energiák értékeire. Ezeket az értékeket az energia kimeneti fájlokból lehet kinyerni, majd átlagolni, végezetül behelyettesíteni a következő összefüggésbe:

$$\Delta G_{\text{kötési}} = \alpha \cdot (\langle V_{\text{l-k}}^{\text{L-J}} \rangle_{\text{kötött}} - \langle V_{\text{l-k}}^{\text{L-J}} \rangle_{\text{szabad}}) + \beta \cdot (\langle V_{\text{l-k}}^{\text{el}} \rangle_{\text{kötött}} - \langle V_{\text{l-k}}^{\text{el}} \rangle_{\text{szabad}}) \tag{5.11}$$

Itt $\langle V_{\text{l-k}}^{\text{L-J}} \rangle$ a ligandum és a környezete közötti nempoláros kölcsönhatási energia átlagértékét jelenti kötött (az ubikinon-4 az elsődleges kinon kötőhelyen van a fehérjében) és szabad (az ubikinon-4 az SPC típusú vízmolekulák alkotta gömb belsejében van) állapotban, míg $\langle V_{\text{l-k}}^{\text{el}} \rangle$ a ligandum és környezete közötti elektrosztatikus potenciális energia átlagértékét jelenti a ligandum kötött és szabad állapotában. Az α és a β empirikus szorzófaktorok. Szimulációink során töltött ligandumokat is alkalmazunk, így az Åqvist által [153] erre az esetre javasolt értékeket használtuk fel: $\alpha = 0{,}181$ és $\beta = 0{,}5$.

RC típus	**Kinon**		**Szemikinon**	
	$\Delta G^{\circ}_{\textbf{kötési}}$ **[kcal/mol]**	$\Delta G^{\circ}_{\textbf{fehérje}}$ **[kcal/mol]**	$\Delta G^{\circ}_{\textbf{kötési}}$ **[kcal/mol]**	$\Delta G^{\circ}_{\textbf{fehérje}}$ **[kcal/mol]**
Vadtípus	-3,39 ± 0,15	-17,29 ± 0,10	15,21 ± 1,81	-51,41 ± 1,38
M265IV	-3,91 ± 0,22	-17,80 ± 0,44	18,14 ± 1,46	-48,48 ± 1,21
M265IS	-4.27 ± 0,17	-18,17 ± 0,31	15,16 ± 1,87	-51,46 ± 0,10
M265IT	-4.45 ± 0,32	-18,34 ± 0,44	12,02 ± 1,86	-54,60 ± 0,97
M218MA	-3.54 ± 0,19	-17,43 ± 0,13	10,49 ± 2,17	-56,13 ± 0,11
M218MG	-2.81 ± 0,19	-16,70 ± 0,25	13,17 ± 1,91	-53,45 ± 0,35

5.6 táblázat A LIE módszerrel meghatározott kötési szabadenergia-értékek kinon és szemikinon állapotokra. A MD szimuláció körülményeinek, valamint a kötési szabadenergia kiszámolásának leírását lásd a szövegben. $\Delta G^{\circ}_{\text{fehérje}}$ kötési szabadenergiának az oldószerben történt szimuláció során kapott korrekció nélküli részét jelenti, mely kizárólag a kinonmolekula és környezetének (fehérje + víz) elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatásaiból származó potenciális energiákat tartalmazza.

A kötési szabadenergiákra kapott eredményeket az 5.6 táblázat tartalmazza. Látható, hogy vadtípus esetében a kísérleti eredménytől (-13,1 kcal/mol) eltérő értéket kaptunk. Az M265-ös mutánsoknál a kinon erősebb kötést mutat, mint vadtípusú RC-nál. Vadtípusú (R-26 és GA) és M265-ös mutáns RC-ok esetében Takahashi és mtsai. [108] különböző kinon analógokra meghatározta a kötési szabadenergiát a Q_A kötőhelyre (5.7 táblázat). A kísérleti eredményekben rendre pozitívabb kötési szabadenergiát kaptak a mutáns RC-okra.

Kinon analóg	$\Delta G^{\circ}_{\textbf{kötési}}$ [kcal/mol] R26	GA	M265IV	M265IS	M265IT
durokinon	-8,97	-8,51		-6,25	-7,67
naftokinon	-7,12	-7,50	-6,86	-5,84	-6,54
2-metil-naftokinon	-8,62	-8,68	-8,32	-6,72	-7,74
antrakinon	-9,31	-9,41	-9,21	-7,92	-8,70

5.7 táblázat Különböző kinon analógok kísérleti úton meghatározott kötési szabadenergiája az elsődleges kinon kötőhelyre vadtípusú (R26 és GA), és mutáns RC-ok esetében [108] alapján.

Szemikinon esetében az oldószerben történt futtatás során nem sikerült meggátolni a vízmolekulák túlpolarizációját (még az LRF közelítés, és a polarizációs megszorítás ellenére sem), így az összes RC-fehérjére pozitív kötési szabadenergiát kaptunk. A pozitív érték nem kötést jelent, így a kinon fehérjén belüli középponti redoxpotenciálját sem tudjuk meghatározni a fejezet bevezetőjében felvázolt termodinamikai ciklus alapján felírt összefüggés (5.10) szerint.

A LIE módszer egyik gyengesége az elektrosztatikus potenciális energiatag meghatározása oldószerben (vízben) lévő töltött ligandumra. A mi esetünkben is emiatt nem tudtuk az egyszeres negatív töltésű szemikinon kötési szabadenergiáit meghatározni. A módszer kinonra is a kísérleti adatoktól értékben és tendenciában eltérő eredményeket adott. A kinonmolekulára is nem nulla parciális atomi töltéseket (csak az össztöltése volt egyenlő nullával) adtunk meg, így az oldószerben történt szimuláció során, a szemiknonhoz hasonlóan, a vízmolekulák túlpolarizációja rossz irányban befolyásolta a potenciális energia elektrosztatikus részét.

5.4.2. Kötési szabadenergiák meghatározása automatizált dokkolással

Az automatizált dokkolás a relatív kötési szabadenergia meghatározásának egy másik lehetséges módja. Ezt a módszert több alkalmazásban is implementálták, mi a legtöbbet hivatkozott AutoDock 3.0.5 (`http://autodock.scripps.edu/`) [154, 155, 156] szoftvercsomagot használtuk. A bemeneti fájlok elkészítéséhez, valamint az eredmények kiértékeléséhez és megjelenítéséhez pedig az AutoDockTools (ADT) 1.4.3 (`http://mgltools.scripps.edu/`) szoftvercsomagot alkalmaztuk.

A RC-fehérje (vadtípus és mutánsok) az ubikinon-4 molekula, és a MD szimuláció alkalmával hozzáadott vízmolekulák dokkoláshoz szükséges bemeneti koordinátái megegyeztek a MD szimuláció végső állapotában kapott koordinátákkal. A mi esetünkben a RC három fehérjealegysége, valamint a hozzáadott vízmolekulák együttesen alkották a dokkolás makromolekuláját, míg az ubikinon-4 molekula játszotta a ligandum szerepét.

A szimulációt megelőzően az ADT segítségével eltávolítottuk az összes hidrogénatomot a fehérjéről, majd a poláros hidrogéneket újra hozzáadtuk. Ezt követően Kollman féle egyesített atomi töltéseket [157] rendeltünk a három fehérjealegység atomjaihoz. A töredéktöltéseket az ADT segítségével korrigáltuk. A vízmolekulákhoz a töltéseket oly módon rendeltük hozzá, hogy azok neutrálisak maradjanak. Ezután egyesítettük a fehérjét és a vízmolekulákat egy makromolekulában, és ezután együttesen kezeltük őket a bemeneti paraméterek definiálása során.

Flexibilis ligandumként az ubikinon-4 molekulánál az egyszeres kötések torziós változtatását engedélyeztük a dokkolás során, ezek száma 13 darab volt. Az atomi töltéseknek az 5.2 és 5.3 táblázatban közölt értékeket adtuk meg kinon és szemikinon állapotokra. A ligandum kiindulási pozíciója a MD szimuláció végső koordinátáinak megfelelő helyen volt,

és eköré definiáltuk azt a 0,375 Å rácsállandójú 70 Å × 70 Å × 70 Å méretű rácsot, melyben a próbaatomokat a dokkolás során az AutoDock próbálja elhelyezni. A hidrogénhíd kötések és a van der Waals kölcsönhatások modellezéséhez a programcsomag saját 12-10 és 12-6 Lenard-Jones paramétereit használtuk. A Mehler és Solmajer [158] féle távolságfüggő permittivitás összefüggést alkalmaztuk az elektrosztatikus rácstérkép generálásához. Minden RC esetében 100 db dokkolást hajtottunk végre a Lamarckian genetikus algoritmus (LGA) felhasználásával (1-1 dokkolás során a létrehozott független populációk száma 150 darab) a generálások maximális számát 27000-ben limitáltuk. A többi paramétert a program alapbeállításainak megfelelően hagytuk.

A kiértékelést az ADT analízis moduljával végeztük. Vadtípusú és a mutáns RC-ok esetében is a legnegatívabb kötési szabadenergiákat vettük figyelembe (5.8 táblázat). A kötési szabadenergiát a végső intermolekuláris energia és a torziós szabadenergia összegeként kaptuk meg.

RC típus	$\Delta G^{\circ}_{\textbf{kötési}}$ **[kcal/mol]**			
	kinon	**szemikinon**		
		szimm.	**aszimm. O2**	**aszimm. O5**
Vadtípus	-13,11	-15,29	-16,54	-16,47
M265IV	-13,40	-15,77	-15,65	-17,23
M265IS	-13,14	-14,57	-15,20	-16,13
M265IT	-11,90	-15,33	-15,29	-16,43
M218MA	-11,49	-16,47	-16,75	-17,83
M218MG	-13,94	-16,52	-16,53	-16,58

5.8 táblázat Lamarckian genetikus algoritmus felhasználásával történt dokkolási szimulációval meghatározott kinon és szemikinon (szimmetrikus és kétféle [O2, O5] aszimmetrikus töltéseloszlás) kötési szabadenergiák vadtípusú és mutáns RC-ra. A szimuláció körülményeinek leírását lásd a szövegben.

Vadtípusú RC-nál a kísérleti eredménnyel szinte megegyező értékű kötési szabadenergiát kaptunk az oxidált kinonra. Figyelembe véve az erős közelítések számát, melyet a szimulációk során alkalmaztunk, kissé meglepő ez az egyezés. A mutánsok esetében három mutánsnál negatívabb (M265IS, M265IT és M218MG), míg kettő estében (M265IV és M218MA) pozitívabb kötési szabadenergiát kaptunk a vadtípushoz képest. Korábban bemutatott (5.7 táblázat) kinon analógok kísérleti eredményei alapján az M265-ös mutánsokra a vadtípushoz képest kevésbé jó kötési affinitást vártunk.

Szemikinon állapotokra a vártnak megfelelő erősebb kötési affinitásokat kaptunk. Érdekes eredmény, hogy általában a szimmetrikus töltéseloszlás esetében kaptuk az abszolút értékben legkisebb kötési szabadenergiát, míg a legerősebb kötési affinitással az O5 karbonil oxigénre súlyozott aszimmetrikus töltéseloszlás rendelkezett minden RC-nál.

Erre az esetre már tudjuk alkalmazni az (5.10) összefüggést, és meg tudjuk adni a különböző RC-ok esetében a kinon középponti redoxpotenciálját (5.9 táblázat).

Kísérleti eredmények alapján a Q_A redoxpotenciálja 10-30 mV körüli érték [64, 146] pH = 7,0-nál vadtípusú RC-fehérjében. A szemikinon szimmetrikus töltéseloszlása esetén ennél 60-80 mV-tal negatívabb értéket kaptunk. Aszimmetrikus töltéseloszlásnál viszont egészen a kísérleti adatokhoz közeli (4 és 1 mV) középponti redoxpotenciálokat kaptunk.

RC típus	E_{Q_A/Q_A^-} [mV]		
	szimm.	**aszimm. O2**	**aszimm. O5**
Vadtípus	-50	4	1
M265IV	-42	-47	21
M265IS	-83	-56	-16
M265IT	5	3	52
M218MA	74	86	133
M218MG	-33	-32	-30

5.9 táblázat Ubikinon-4 molekula középponti redoxpotenciálja a RC-fehérje elsődleges kinon kötőhelyén vadtípusú és mutáns RC-ok esetében. A redoxpotenciált az (5.10) összefüggés alapján határoztuk meg, ahol E_{Q/Q^-} = -145 mV [145]. A különböző állapotokhoz tartozó kötési szabadenergiáknak az 5.8 táblázat adatait használtuk fel. A szemikinon töltését egy szimmetrikus és két aszimmetrikus töltéseloszlással modelleztük.

Az 5.1-es fejezetben közölt késleltetett és prompt fluoreszcencia intenzitás viszonyainak alapján meghatározott szabadenergia-különbség értékekből kiszámoltuk a kinon redoxpotenciál eltolódásának mértékét a különböző mutáns RC-ban a vadtípusú RC-hoz képest. Az 5.10 táblázat adatai alapján ugyanezt megtehetjük a dokkolási szimulációval kapott eredményekre is. Az 5.10 táblázat tartalmazza az eltolódás meghatározott értékeit.

Az M265IS mutáns esetében a szimulációval kapott érték megfelelő irányban tolódik el a vadtípushoz képest, és az O2 karbonil oxingénre súlyozott töltéseloszlás esetén azonos mértékű az eltolódás a kísérletileg meghatározottal.

Az M265IT és az M218MA esetében a kísérleti eredmények alapján elvárt irányhoz képest ellentétes eltolódást kaptunk.

RC típus	E_{Q_A/Q_A^-} eltolódás a vadtípushoz képest [mV]			
	szimm.	**aszimm. O2**	**aszimm. O5**	**KF mérés alapján**
M265IV	8	-51	20	0
M265IS	-33	-60	-17	-60
M265IT	55	-1	51	-115
M218MA	124	82	132	-55
M218MG	22	-36	-29	-85

5.10 táblázat A kinon középponti redoxpotenciáljának eltolódása a mutáns RC-ban a vadtípusú RC-hez képest. A dokkolási szimulációval kapott eredmények összehasonlítása a késleltetett és prompt fluoreszcencia intenzitás viszonyaiból meghatározott kísérleti eredményekkel. Szimulációs értékeket az 5.9 táblázat adatainak felhasználásával kaptuk.

Az M265IV és az M218MG esetében az eltolódás iránya háromból két töltéseloszlás modellnél megfelel a kísérletileg elvárt iránnyal, de az eltolódás mértéke különbözik attól.

Kijelenthetjük, hogy a dokkolási szimulációk során kapott kötési szabadenergiák a kísérletileg elvárt nagyságrendbe estek, de a töltött ligandumok esetében a kötési szabadenergiák nem változtak akkora mértékben, mint azt a kísérleti adatok alapján elvártuk volna.

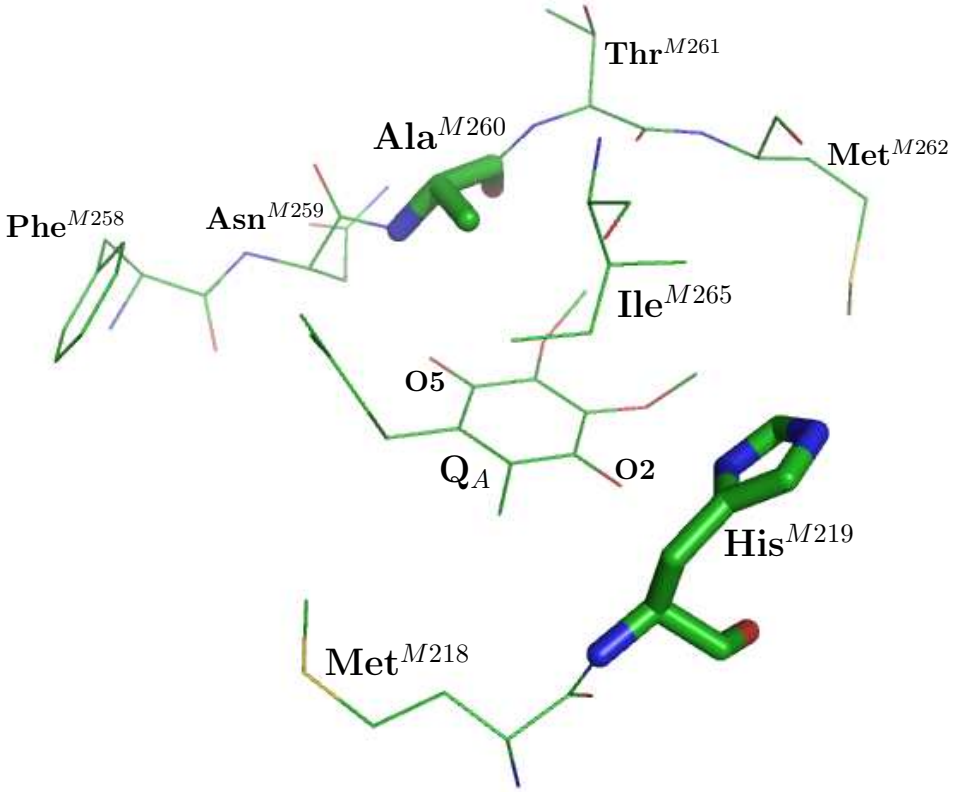
A kinonmolekula fehérjén belüli stabilizációja szempontjából fontos szerepe van a molekula és környezete között kialalkult hidrogénhíd kötéseknek. Az elsődleges kinon esetében a molekula két karbonil-csoportja tud hidrogénhíd kötéseket kialakítani a környező aminosavakkal és vízmolakulákkal. FTIR vizsgálatok segítségével Breton és mtsai. [159] megállapították, hogy az elsődleges kinon két karbonil-csoportja eltérően viselkedik a redukció folyamán.

RC típus	**Atom neve**		**Távolság [Å]**	
	kinon	**környezet**	**kinon**	**szemikinon**
Vadtípus	UQA:O2	His^{M219}:HD1		1,81
	UQA:O5	HOH^{890}:H2		2,24
M265IV	UQA:O2	His^{M219}:HD1		1,53
	UQA:O5	Ala^{M260}:HN	2,19	2,13
M265IS	UQA:O2	His^{M219}:HD1		2,17
	UQA:O2	Thr^{M222}:HG1		2,32
	UQA:O5	Ala^{M260}:HN	2,24	1,83
M265IT	UQA:O2	His^{M219}:HD1		1,91
M218MA	UQA:O2	His^{M219}:HD1		1,64
	UQA:O5	Asn^{M259}:HD22		1,70
	UQA:O5	Ala^{M260}:HN		2,06
M218MA	UQA:O2	His^{M219}:HD1		1,85
	UQA:O5	Ala^{M260}:HN		1,78

5.11 táblázat A hidrogénhíd kötések számának és kötéstávolságának változása a dokkolási szimuláció során, vadtípusú és mutáns RC-oknál. A lehetséges hidrogénhíd távolságokat ($<$ 3,0 Å) mutatjuk kinon és szemikinon állapotokban. A szemikinon minden esetben szimmetrikus töltéseloszlású. A vizsgált szerkezetek az adott ligandum legnegatívabb kötési szabadenergiájához tartozó stuktúrák voltak.

A korábbi röntgendiffrakciós szerkezetek alapján [5, 160] azt feltételezeték, hogy a C5=O karbonil-csoport az Ala^{M260} peptid NH-jével, míg a C2=O karbonil-csoport a His^{M219} HD1 protonjával képez hidrogénhíd kötést. Az FTIR vizsgálatok eredményei azonban azt mutatták, hogy a C5=O karbonil-csoport nem vesz részt erős hidrogénhíd kötésben, ellenben a C1=O karbonil-csoport a redukció folyamán nagyon erős kapcsolatott épít ki a His^{M219}-nel [159].

A kinon- és szemikinonmolekula dokkolási szimulációt követően a legnegatívabb kötési szabadenergiákhoz tartozó szerkezeteknél megvizsgáltuk a ligandum és környezete között kialakult hidrogénhíd kötések mennyiségének a változását (5.11 táblázat). Látható, hogy szemikinon állapotban megnő a hidrogénhidak száma, valamint minden RC-nál szemikinon esetében a His^{M219} hidrogénhíd kötésbe lép a kinon C2=O karbonil-csoportjával. Érdekes körülmény, hogy az M265IV és M265IS mutánsoknál kinon és szemikinon állapotban is hidrogénhíd kötést létesít a C5=O karbonil-csoport az Ala^{M260}-nal (5.21 ábra).



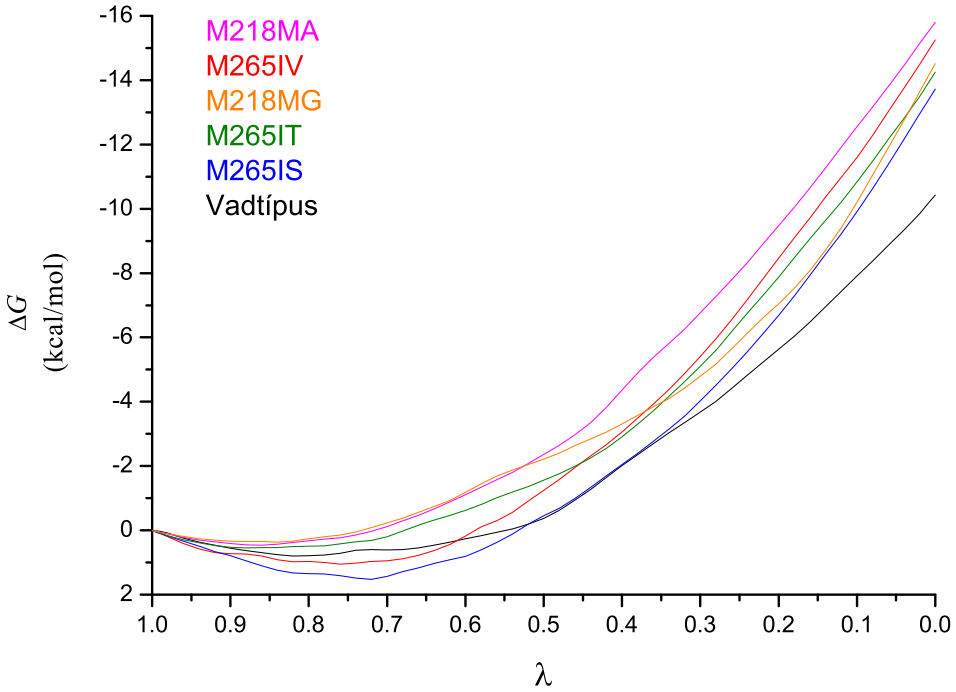
5.21 ábra Az elsődleges kinon fehérjekörnyezete az 1AIJ struktúra alapján [35]. A His^{M219}-es és az Ala^{M260}-as reziduumokat megvastagítva jelöltük. A Q$_A$-t, valamint a többi ábrán szereplő aminosavat vonalábrázolással mutatjuk be. Külön feliratoztuk a kinon két karbonil oxigénjét. A könnyebb átláthatóság miatt a kinonmolekulát csak az első izoprén egységig ábrázoltuk. A kép a PyMOL szoftver segítségével készült [144].

5.4.3. FEP szimuláció a kinon redoxállapot-változásának modellezésére reakciócentrum-fehérjében

Szabadenergia perturbáció szimuláció segítségével két termodinamikai állapot közötti szabadenergia-különbséget tudunk meghatározni oly módon, hogy az egyik termodinamikai állapotból kicsiny lépésekben kevert állapotokon keresztül a másik termodinamikai állapotba jutunk. Jelen esetben ez a két termodinamikai állapot a kinon redukált, illetve oxidált állapota a RC-fehérjén belül.

A FEP szimulációkhoz szintén a Q-package [147] szoftvercsomagot alkalmaztuk. A futtatások során kétféle kezdeti strukturális állapotot használtunk: egyrészt az 1AIJ kristályszerkezeti koordinátákat, mint vadtípust, illetve az abból PyMOL segítségével készített mutáns szerkezeteket, másrészt az ubikinon-4 oxidált állapotában történt MD szimulációk (vadtípusú és mutáns RC-ban) végső koordinátáit. Egyéb, a szerkezetre vonatkozó kiindulási paraméterek megegyeztek, a LIE szimulációk során alkalmazottakkal.

A perturbációt a kinon töltéseinek 5.2 és 5.3 táblázatban bemutatott megváltozása jelentette, valamint a két karbonil-oxigén Gromos87 erőtér paraméterkészlet [122] szerinti atomtípusát is megváltoztattuk (O.2 $\longrightarrow$ O.2-).

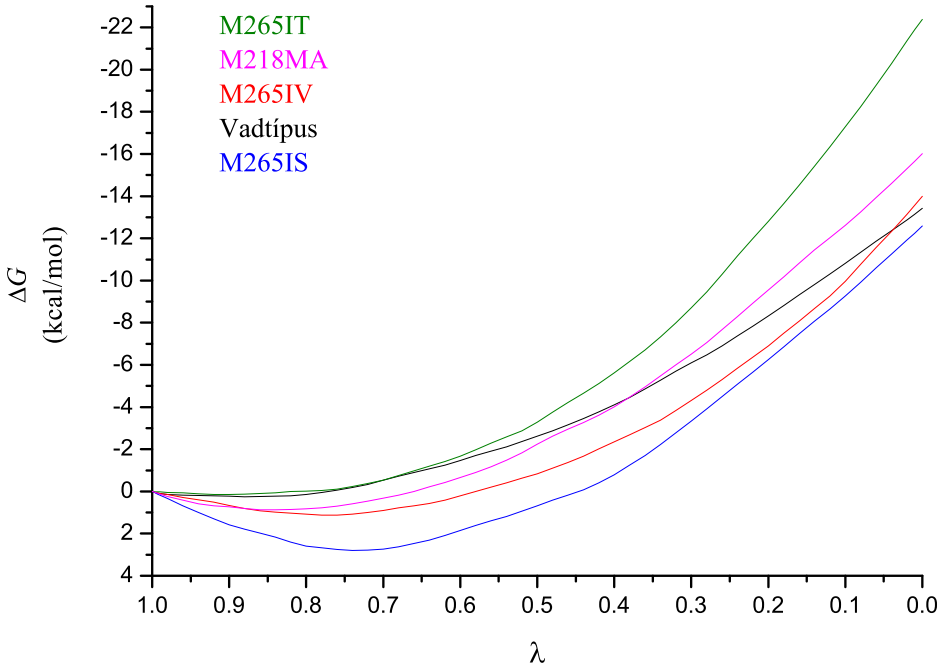


5.22 ábra Átlagos szabadenergia-változás a λ csatolási paraméter függvényében a kinon atomi töltéseinek perturbációja során (össztöltés = 0 [$\lambda = 1$], össztöltés = -1 [$\lambda = 0$]). Az eredményeket a szemikinon szimmetrikus töltéseloszlásnál kaptuk. Kiindulási struktúrák az 1AIJ kristályszerkezet, mint vadtípus, illetve a PyMOL mutagenézis moduljával készített mutánsok voltak, megelőző MD szimuláció nélkül. A FEP szimuláció körülményeit lásd a szövegben.

Először a rendszer relaxációját, majd egyensúlyi állapotba kerülését elősegítő négy lépéses szimuláció sorozatot hajtottunk végre (1 K-en 200 fs-ig, 50 K-en 6 ps-ig, 150-en

2 ps-ig és 300 K-en 50 ps-ig) erős hőmérsékleti csatolás mellett. Ezt követte a tényleges FEP szimuláció, 55 különböző λ értéknél: [1,0] és [0,1] tartományban 6-6 ps-ig (1,5 fs-os lépésidővel) gyűjtöttük az adatokat 300 K állandó hőmérsékleten. Az elektrosztatikus kölcsönhatások 10 Å távolságon kívüli kiterjesztéséhez az LRF módszert [151] alkalmaztuk. A SHAKE eljárást használtuk a vízmolekulák kötés és kötésszög, valamint a fehérje molekulákon belüli kötések kényszerfeltételeihez. A gömbszimmetrikus oldószertér felszínéhez közeli vízmolekulákat polarizációra vonatkozó megszorítás [161] alá rendeltük.

Kiindulási állapotban a kinon össztöltés nulla volt ($\lambda = 1$), majd minden egyes lépésben fokozatosan közeledett a végső egyszeres negatív össztöltésű szemikinon végállapothoz ($\lambda = 0$). Az 5.22 ábrán és 5.23 ábrákon mutatjuk be az átlagos (az előrehaladó: $\lambda = 1 \longrightarrow 0$ és visszirányú: $\lambda = 0 \longrightarrow 1$ szimulációk átlagos értéke) szabadenergia-változást a λ paraméter függvényében, ahol a perturbációt a kinon össztöltésének megváltozása jelenti: $\lambda = 1$-nél 0, míg $\lambda = 0$-nál -1. Az 5.22 ábrához tartozó FEP szimulációk során a kiindulási koordináták a kristályszerkezet által meghatározott adatok voltak, illetve az azokból PyMOL mutagenézis moduljával készített mutánsok. Az 5.23 ábrához tartozó szimulációk alkalmával az előzőleg MD szimuláción átesett struktúrák jelentették a kiindulási állapotokat meghatározó szerkezeteket.



5.23 ábra Átlagos szabadenergia-változás a λ csatolási paraméter függvényében a kinon atomi töltéseinek perturbációja során (össztöltés = 0 [$\lambda = 1$], össztöltés = -1 [$\lambda = 0$]). Az eredmények a szemikinon szimmetrikus töltéseloszlása esetében kaptuk. Kiindulási szerkezetekként a megelőző MD szimuláció végső állapotait használtuk fel. A FEP szimuláció körülményeit lásd a szövegben.

A két szimuláció sorozat eredményei egymástól (ha nem is látványosan, de) eltérnek. A jobb összehasonlíthatóság miatt táblázatba rendeztük a kiindulási és végállapot közötti

szabadenergia-különbségeket a különböző kiindulási struktúrák, és a szemikinon különböző töltéseloszlásai szerint (5.12 táblázat).

RC típus	ΔG **[kcal/mol]**					
	MD nélküli struktúra			**MD utáni struktúra**		
	sz.	**asz. O2**	**asz. O5**	**sz.**	**asz. O2**	**asz. O5**
Vadtípus	-10,432	-66,312	-34,103	-13,431	-51,312	-30,255
M265IV	-15,250	-65,871	-27,731	-13,989	-65,201	-39,342
M265IS	-13,722	-66,635	-31,759	-12,583	-62,969	-26,298
M265IT	-14,253	-71,218	-33,696	-22,381	-64,750	-46,862
M218MA	-15,802	-63,112	-19,247	-16,022	-69,637	
M218MG	-14,517	-69,834	-32,623			

5.12 táblázat A FEP szimuláció során kapott kiindulási (kinon össztöltés = 0) és végállapot (kinon össztöltés = -1) közötti szabadenergia-különbségek vadtípusú és mutáns RC-fehérje szerkezetekre különböző szemikinon töltéseloszlásoknál (sz. = szimmetrikus, asz. O2 = aszimmetrikus O2 súlyozott, asz. O5 = aszimmetrikus O5-re súlyozott). A jobb oldali eredmények a MD szimuláció utáni strukturákra vonatkoznak, míg a bal oldali struktúráknál nem hajtottunk végre megelőző MD szimulációt.

Kiszámíthatjuk a mutációk hatására bekövetkezett szabadenergia-különbségek (mely a kinon RC-fehérjén belüli redukálódását jellemzi) megváltozását a vadtípushoz képest (5.13 táblázat).

RC típus	$\Delta\Delta G$ **[kcal/mol]**					
	MD nélküli struktúra			**MD utáni struktúra**		
	sz.	**asz. O2**	**asz. O5**	**sz.**	**asz. O2**	**asz. O5**
M265IV	-4,818	0,445	6,372	-0,558	-13,889	-9,087
M265IS	-3,290	-0,319	2,344	0,848	-11,657	3,957
M265IT	-3,821	-4,902	0,407	-8,950	-13,438	-16,607
M218MA	-5,370	3,204	14,856	-2,591	-18,325	
M218MG	-4,085	-3,518	1,480			

5.13 táblázat Relatív szabadenergia-különbség a vadtípushoz képest a mutáns RC-oknál az 5.12 táblázat adatainak felhasználásával. A táblázatban használt jelölések megegyeznek az 5.12 táblázat jelöléseivel.

Az eredeti kristályszerkezeten alapuló FEP szimulációk esetében a szemikinon szimmetrikus töltéseloszlásánál rendre negatívabb értékeket kaptunk, ami megfelel az elvárt iránynak, viszont a különböző mutánsoknál kapott változás mértéke eltér a kísérleti adatok alapján elvárt szinttől. A kísérleti eredmények alapján a vadtípushoz és az M265IV mutánshoz tartozó szabadenergia-különbségek között kicsiny eltérést várnánk, ezzel szemben a vadtípushoz képest a második legnagyobb változást pont az M265IV-nél tapasztaltuk.

A kinon aszimmetrikus töltéseloszlásánál (O5-re tolódásnál) a kísérlet alapján elvárt iránnyal ellentétes változást kaptunk.

MD szimulációt követő kiindulási struktúránál a kísérleti eredmények alapján várható irányú és egymáshoz képest helyes sorrendű változást kaptunk M265IV, M218MA és M265IT mutánsoknál. Az M265IS-nél viszont ellentétes irányú változást tapasztaltunk.

RC típus	**Atom neve**		**Távolság [Å]**	
	kinon	**környezet**	**kinon**	**szemikinon**
Vadtípus	UQA:O2	Thr^{M222}:HG1	3,31	**1,48**
	UQA:O2	Trp^{M252}:HE1	3,33	**2,12**
	UQA:O5	Ala^{M260}:H	3,09	**1,65**
M265IV	UQA:O2	Thr^{M222}:HG1	3,38	**1,77**
	UQA:O2	HOH^{1282}:H2	5,48	**1,79**
	UQA:O5	HOH^{1130}:H2	3,38	**1,65**
M265IS	UQA:O2	His^{M219}:HD1	3,17	**1,77**
	UQA:O2	Thr^{M222}:HG1	**2,48**	**2,16**
	UQA:O2	Trp^{M252}:HE1	3,40	**2,88**
	UQA:O5	Ala^{M260}:H	**2,51**	**1,69**
M265IT	UQA:O2	Thr^{M222}:HG1	**1,82**	**1,50**
	UQA:O2	Trp^{M252}:HE1	**2,68**	3,40
	UQA:O5	Thr^{M265}:HG1	5,42	**1,99**
	UQA:O5	HOH^{1163}:H2	**1,71**	**1,55**
M218MA	UQA:O2	His^{M219}:HD1	4,55	**2,60**
	UQA:O2	Thr^{M222}:HG1	3,31	**1,56**
	UQA:O5	Ala^{M260}:H	**2,65**	**2,50**

5.14 táblázat A hidrogénhíd kötések számának és kötéstávolságának változása a FEP szimuláció során, vadtípusú és mutáns RC-oknál. A lehetséges hidrogénhíd távolságokat ($<$ 3,0 Å) megvastagítással jelöltük. A sturktúrákon előzetes MD szimulációt hajtottunk végre, és a szemikinon minden esetben szimmetrikus töltéseloszlású.

A FEP szimuláció kiindulási (kinon) és végállapotaiban (szemikinon) megvizsgálva a szerkezeteket feltérképeztük a kinon karbonil csoportja és a környezet között kialakult hidrogénhíd kötések számának és kötéstávolságának a változását (5.14 táblázat). Minden esetben a hidrogénhíd kötések számának a növekedését és/vagy a kötéstávolságok csökkenését figyelhettük meg a kinonmolekula redukálódása során. Ez a tendencia egybevág a korábbi tapasztaltokkal, mely szerint az elsődleges kinon állapotát stabilizálja az elektron felvétele.

A kinon/szemikinon stabilizációját szintén befolyásolja a két metoxi-csoport térbeli elhelyezkedése a kinon-gyűrű síkjához képest. A metoxi-csoport elektron hozzájárulása a delokalizált elektronokhoz maximális abban az esetben, ha a O-CH_3 kötés a kinon-gyűrű

síkjában helyezkedik el (ezt nevezik szabad metoxi-csoportnak). A rendelkezésre álló struktúrákat megnézve bizonyos szerkezetekben az egyik metoxi-csoport a kinon-gyűrű síkjában helyezkedik el, míg a másik kilép ebből a síkból [37, 162] más szerkezetekben [35] viszont mindkét metoxi-csoport kiáll a kinon-gyűrű síkjából. A legújabb FTIR mérések az utóbbi konformációt valószínűsítik mindkét (elsődleges és másodlagos) kinon esetében [163]. Kvantumkémiai modell-számítások (szemi-empírikus és sürüségfunkcionál elmélet (DFT)) alapján [128, 164] kinon állapotban ez első konformáció valószínűbb (egyik metoxi-csoport a kinon síkban helyezkedik el, míg a másik nem) és a metoxi-csoportok nyílásszöge 90°/90° vagy 90°/270°, míg egyszeresen redukált szemikinon állapotban mindkét metoxi-csoport kiáll a síkból és nyílásszögük 90°/90° vagy 90°/270°.

A FEP szimuláció során minden RC és konformáció esetében a két metoxi-csoport (C3-O3-C3M és C4-O4-C4M) kiállt a kinongyűrű síkjából. Az 5.15 táblázat tartalmazza a metoxi-csoportok nyílásszögeinek értékeit a FEP szimuláció kiinduló (kinon) és végállapotában (szemikinon) a különböző RC-okra. Számottevő változás (13-15 °) csak két mutáns (M265IS és M218MA) esetében figyelhető meg a C3-O3-C3M metoxi-csoportnál. Mindkét esetben a szemikinon állapotban megnő a nyílásszög.

RC típus	**Metoxi csoport**	**Kinon**		**Szemikinon**	
		nyílásszöge [°]	$V_{\text{szög}}$ **[kcal/mol]**	**nyílásszöge [°]**	$V_{\text{szög}}$ **[kcal/mol]**
Vadtípus					
	C3-O3-C3M	117,33	1,02	118,58	1,37
	C4-O4-C4M	117,08	0,96	116,67	0,86
M265IV					
	C3-O3-C3M	110,40	0,01	112,63	0,16
	C4-O4-C4M	115,15	0,53	112,95	0,20
M265IS					
	C3-O3-C3M	110,27	0,01	123,95	3,48
	C4-O4-C4M	113,93	0,33	115,41	0,58
M265IT					
	C3-O3-C3M	111,96	0,10	112,36	0,14
	C4-O4-C4M	124,12	3,56	121,17	2,27
M218MA					
	C3-O3-C3M	105,07	0,33	120,17	1,90
	C4-O4-C4M	114,07	0,35	112,98	0,20

5.15 táblázat A kinonmolekulához tartozó két metoxi-csoport atomjai által bezárt nyílásszög nagyságának és a hozzátartozó potenciális energiának ($V_{\text{szög}}$) a megváltozása a FEP szimuláció során vadtípusú és mutáns RC-okra. A struktúrákon előzetes MD szimulációt hajtottunk végre, és a szemikinon minden esetben szimmetrikus töltéseloszlású.

A vadtípusú és az M265-ös mutáns RC-oknál megvizsgáltuk az Ala^{M260} C_β metil szénatomja és az M265-ös reziduum C_β szénatomja közötti távolságot, és annak változását a FEP szimuláció kiindulási és végállapotában (5.16 táblázat).

RC típus	reziduum-C_β C_β-Ala^{M260} távolság [Å]	
	kinon	**szemikinon**
Vadtípus	3,47	3,58
M265IV	5,33	5,40
M265IS	4,08	3,84
M265IT	4,44	4,97

5.16 táblázat Az Ala^{M260} metil C_β szénatomja és az M265-ös reziduum C_β szénatomja közötti távolság a FEP szimuláció kiindulási (kinon) és végállapotában (szemikinon) vadtípusú és M265-ös mutáns RC-oknál. A sturktúrákon előzetes MD szimulációt hajtottunk végre, és a szemikinon minden esetben szimmetrikus töltéseloszlással rendelkezik.

A vadtípushoz képest a legnagyobb eltérés az M265IV mutánsnál látható. Itt $\approx$ 2 Å-mel eltávolodik a valin C_β szénatomja az alanin szénatomjától. A poláros mutánsoknál a kinon redukciója során ellentétes viselkedés figyelhető meg. A szerin C_β szénatomja 0,2 Å-mel közelebb kerül az alaninhoz, míg a treonin szénatomja 0,5 Å-mel eltávolodik attól.

Érdekes információ a treoninnal kapcsolatban, hogy szemikinon állapotban hidrogénhíd kötéstávolságon belülre kerül a szemikinon O5 karbonil oxigénjéhez. Kinon állapotban, akárcsak a vadtípus, 5 Å-nél nagyobb távolágra van az oxigéntől. A mutánsok közzül egyedül az M265IT-nél mutat ekkora strukturális változást az M265-ös reziduum megváltoztatása.

6. fejezet

Összefoglalás

1. A bakterioklorolfill dimér késleltetett és prompt fluoreszcencia intenzitásának összehasonlításával (az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon) meghatároztam az első stabil töltéspár ($P^*Q_A^-$) szabadenergia-szintjét a P^* szinthez képest *Rhodobacter sphaeroides* GA vadtípusú, és az elsődleges kinon akceptor közeli mutáns reakciócentrumoknál a fiziológiás pH tartományban. A GA vadtípus esetében a két állapot közötti szabadenergia-különbségre -890 ± 5 meV-ot kaptam pH = 8,0-nál. (II)

2. Az M265IV apoláros mutánsnál a GA vadtípushoz hasonló késleltetett fluoreszcencia intenzitásokat mértem a fiziológiás pH tartományban. A $P^+Q_A^-$ és P^* állapotok közötti szabadenergia-különbség (ΔG_{P^*A}) értéke pH = 8,0-nál -890 ± 10 meV, amely megegyezik a vadtípusú reakciócentrumnál kapott eredménnyel. Az M265IV mutánsra meghatározott ΔG_{P^*A} (ellentétben a vadtípussal) pH = 10-ig nem mutat pH-függést. Az eltérő pH-függés miatt pH = 10,5-nél a szabadenergia-különbségre (a GA vadtípushoz viszonyítva) már 20 meV-tal negatívabb értéket kaptam. (II)

3. Az M265 poláros mutánsainál (M265IS, M265IT) a GA vadtípushoz képest nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitásokat mértem az egész fiziológiás pH tartományban. Ennek megfelelően ennél a két mutánsnál a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség lecsökken a vadtípushoz képest. A ΔG_{P^*A} értékére pH = 8,0-nál M265IS mutánsra -830 ± 10 meV-ot, míg M265IT mutánsra -775 ± 5 meV-ot kaptam. Összehasonlítva a GA vadtípusú reakciócentrumnál kapott értékkel ez azt jelenti, hogy az elsődleges kinon középponti redoxpotenciálja M265IS-nél -60 mV, míg M265IT-nél -115 mV értékkel eltolódik.
   A rendelkezésre álló szerkezeti adatokból és a korábbi FTIR mérések eredményei alapján a megfigyelt jelenségre a következő magyarázatot adom: A poláros mutánsoknál változás következik be a kinon karbonil oxigénjei és a környező aminosavak közötti hidrogénhíd távolságokban. A szerin és a treonin hidroxil csoportja hidrogénhíd kötést alakíthat ki a Thr^{M261}-es reziduum peptid karbonil oxigénjével, és ezzel az M259-M262 reziduum csoport peptidvázát megfeszíti, és eltolja a kinon környezetéből. Eltávolodik az Ala^{M260} is, mely hidrogénhíd távolságon belül helyezkedik el a natív ubikinon-10 C_2=O karbonil csoportjához képest. A megváltozott környezet és stabilizáló hidrogénhíd kötések átrendeződése felelős az elsődleges kinon redoxtulajdonságainak megváltozásáért. (II)

4. Az M218MA és M218MG mutánsoknál a GA vadtípushoz képest szintén nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitásokat mértem az egész fiziológiás pH tartomány-

ban. A ΔG_{P*A} értékére pH = 8,0-nál M218MA mutánsra -835 ± 20 meV-ot, míg M218MG mutánsra -805 ± 10 meV-ot kaptam. Ezeket az értékeket összehasonlítva a GA vadtípusra kapott eredménnyel megállapítottam, hogy az elsődleges kinon középponti redoxpotenciálja az M218MA mutánsnál -55 mV, míg M218MG-nél -85 mV értékkel eltolódik. A ΔG_{P*A} pH-függésének lefutása hasonló, a GA vadtípushoz és az M265-ös mutánsokhoz.
Az M218-as mutánsok esetében a $P^+Q_A^-$ állapotból történő töltésrekombináció (k_P^A (M218MA) = 27 s^{-1} és k_P^A(M218MG) = 38s^{-1}) szignifikánsan gyorsabb, mint a vadtípusú reakciócentrumnál (k_P^A(GA) = 9.5 s^{-1}). Natív ubikinon-10-nél, és vadtípusú reakciócentrumnál a töltésrekombináció alagutazással történik a Q_A-ról a P^+-ra. Ha azonban a mutáció hatására a Q_A redoxpotenciálja alacsonyabbá (negatívabbá) válik, akkor a $P^+Bfeo_A^-$-on keresztüli termikus aktivációs rekombinációs út is megnyílik. A $P^+Q_A^-$ állapotból történő töltésrekombináció sebességének felgyorsulása (k_P^A) egyértelmű jele a termikus aktivációs út bekapcsolódásának.
Az atomi szerkezetet alapul véve a tapasztalt változásra az alábbi magyarázat adható: a helyettesített alanin és glicin aminosavak sokkal kisebb térkitöltésűek, mint a vadtípus metioninja, mely a $Bfeo_A$ és a Q_A között helyezkedik el, és az elektronok Bfeo-ről Q_A-ra történő alagutazásában játszik kulcsszerepet. Az elektronoknak a metionon keresztüli út mellett a Trp^{M252}-on át vezető útvonal is rendelkezésére áll, és közelítőleg azonos valószínűséggel veszik igénybe a primér kinon redukálására. A Q_A helyen natív ubikinon-10-nek antrakinonnal való helyettesítésénél a töltésrekombinációkból meghatározott redoxpotenciál eltolódás kisebb mértékű volt az M218-as mutáns reakciócentrumnál, így a kisebb térkitöltésű aminosavak miatt több vízmolekula helyezkedik el az elsődleges kinon környezetében. Ezzel megváltozik annak sztérikus és elektrosztatikus kölcsönhatása a környezetével. Az antrakinon, mivel jobban kitölti a rendelkezésre álló teret, kevesebb plusz vízmolekula bejutását engedi a megnövekedett térbe, így kisebb mértékű a középponti redoxpotenciáljának az eltolódása. (II)

5. Megfigyeltem, hogy ha a detergenssel izolált reakciócentrumhoz kardiolipint adtam, akkor a másodlagos kinonról történő töltésrekombináció ($P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$) nagymértékben lelassult. Az effektus a fél telítési állapotot 10-20 μM kardiolipin hozzáadása esetén érte el. Mivel izolált reakciócentrum esetében a töltésrekombináció a másodlagos kinonról főként a $P^+Q_A^-$-on keresztül indirekt módon történik, így emiatt a $Q_A^-Q_B \leftrightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer egyensúlyi állandója megnövekszik. Ez a lassulás 100 μM kardiolipin hozzáadása esetén pH = 8,0-nál körülbelül háromszoros, ami a Q_A^- és Q_B szabadenergia-szintek közötti különbség 30 meV-os növekedésére utal. Ez a növekedés a két állapot közötti szabadenergia-különbségben az egész fiziológiás pH tartományban (pH = 6-tól 10.5-ig) állandó marad. Kardiolipin hozzáadása esetén a lassú fázis relatív amplitúdója 70%-ról 90%-ra nő a töltésrekombináció kinetikájában, ami a Q_B hely betöltöttségének növekedését jelenti.
Egykinonos (terbutrinnal gátoltam a másodlagos kinon kötőhelyet) izolált GA vadtípusú reakciócentrumnál a késleltetett fluoreszcencia intenzitása 5-7-szeresre nőtt kardiolipin jelenlétében. A ΔG_{P*A} szabadenergia-különbség értéke 30 ± 10 meV-tal csökkent a kardiolipin hozzáadását követően. A $P^+Q_A^-$ állapotból mérhető késleltetett fluoreszcencia intenzitásának növekedése, valamint a másodlagos kinonról történő töltésrekombináció lassulása arra utal, hogy a kardiolipin bekötődése a reakciócentrumhoz 30 - 40 mV-tal negatív irányban eltolja az elsődleges kinon középponti redoxpotencálját. (II)

6. Megállapítottam, hogy megegyező reakciócentrum koncentráció mellett két nagyságrenddel nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitást mértem membránba ágyazott reakciócentrum (kromatofora) esetében, mint detergens oldatban. Ennek oka lehet, hogy a kromatofora membránjába ágyazott reakciócentrum egyrészt más környezetben van, másrészt más kölcsönhatásokban vesz részt, mint a detergenssel oldatba vitt (feloldott) reakciócentrum. Micelláris oldatban a fehérje a körülötte lazán és kevéssé strukturált módon elhelyezkedő detergensekkel többnyire csak gyenge kölcsönhatást alakít ki. Ezzel szemben a membránfrakciókban meghatározó jelentőségű lehet a membrán lipidjeivel való szorosabb és specifikus kölcsönhatás, amelynek eredményeképp jelentősen eltolódhat a primér kinon középponti redoxpotenciálja.
   Az előző tézispontok alapján látható, hogy a Q_A körüli aminosavak mutációja jelentősen el tudja tolni a Q_A/Q_A^- redox pár középponti potenciálját, amely (amennyiben a negatívabb potenciálok irányában történik) a megfigyelt késleltetett fluoreszcencia nagymértékű (exponenciálisan emelkedő) változását váltja ki. Hasonló effektust figyeltünk meg a kardiolipin és a reakciócentrum kölcsönhatásában, amely a membránbeli természetes viszonyok nagyon közeli modelljének tekinthető. Több hasonló vizsgálat is alátámasztja azt az elképzelést, hogy természetes membránba ágyazva a Q_A/Q_A^- redox pár középponti potenciálja 100 mV értékkel is negatívabb lehet a detergens oldatbeli értékéhez képest. Ezekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a késleltetett fluoreszcencia intenzitásában megfigyelt változás meghatározó effektusa a természetes membrán lipidjei és a reakciócentrum redox centrumai közötti energetikai csatolás.

7. Ikerionikus detergensnek (LDAO) kromatoforához való fokozatos adagolása során a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának drasztikus (1-2 nagyságrendű) csökkenését, illetve a prompt fluoreszcencia mérsékelt (2-3-szoros) emelkedését figyeltem meg. A kromatoforát, szemben az izolált reakciócentrummal, nem csupán a reakciócentrum-membrán-lipid kölcsönhatás jellemzi, hanem a reakciócentrumnak az antenna-rendszerrel kialakítható szoros kapcsolata is. Míg izolált reakciócentrumban a késleltetett fluoreszcencia kizárólag a dimérből eredeztethető, addig kromatoforában fennáll annak a lehetősége is, hogy a visszreakcióval előállt P^* állapot nem dezaktiválódik késleltetett fluoreszcencia foton alakjában, hanem energia-(exciton)vándorlás révén az antenna-rendszerben delokalizálódik. A fotont valamelyik antenna pigment fogja emittálni, de ennek hatásfoka már nem szükségképp azonos a dimér fluoreszcencia hatásfokával.
   Az LDAO koncentrációjának növekedése a reakciócentrum és az antennarendszer közötti kapcsolat lazulását, illetve teljes felszakadását eredményezi. A mérési eredmények arra engednek következtetni, hogy a fluoreszcencia hatásfoka attól függően különbözik, hogy az elektron gerjesztett állapot (exciton) a reakciócentrum dimérben, vagy az antenna egyik bakterioklorofilljában dezaktiválódik. Az LDAO titráláson alapuló méréseim inkább azt valószínűsítik, hogy az antennában kisebb hatásfokú a fluoreszcencia emissziója, mint a reakciócentrum dimérben.

8. Q_A és Q_B között gátolva az eletronátadást a kromatofora késleltetett fluoreszcencia kinetikájának milliszekundumos időtartományában a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ visszreakciót tükröző lassú lecsengés ($\approx$ 100 ms élettartam) mellett egy gyors (10 ms körüli élettartamú) komponens megjelenését figyeltem meg, amelynek nincs megfelelője sem a detergenssel feloldott (izolált) reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciájában, sem a hasonló körülmények között felvett és az oxidált dimérre jellemző abszorpció változásában. Ez legegyszerűbben úgy értelmezhető, hogy a gyors komponenssel jellemez-

hető átmeneti állapot a $P^+Q_A^-$ töltésszeparált állapot és fehérjekörnyezetének még nem relaxált formája, amelynek meglehetősen hosszú időre van szüksége az egyensúly visszanyerésére. Mivel mind a relaxálatlan, mind a relaxált állapot ugyanahhoz a redox állapothoz tartozik, ezért közöttük abszorpcióban nem tudunk különbséget tenni, azaz a relaxálatlan állapot "csendes". A késleltetett fluoreszcenciája alapján azonban megkülönböztethető a két állapot.
A kromatoforában megfigyelt késleltetett fluoreszcencia gyors és lassú komponensei számos kezelés hatására hasonlóan viselkednek. A komponensek kialakulásáért felelős állapotok szabadenergiáinak pH-függése nagy hasonlatosságot mutat, akárcsak az LDAO detergenssel való kölcsönhatásuk, az aktuális redoxpotenciáltól való függésük, vagy a külső elektron donorokkal (ferrocen, TMPD) szembeni viselkedésük. Mindezek a hasonlóságok azt jelzik, hogy közeli és megegyező alaptulajdonságú állapotokhoz köthető a két komponens. Jelentősebb eltérést a hőmérséklet változtatásával szembeni viselkedés mutatott. A van't Hoff ábrázolások egyértelműen jelezték, hogy két teljesen eltérő entalpia- és entrópia-változás jellemzi a $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$ folyamatot a gyors és a lassú komponensek esetében. A nem relaxált $P^+Q_A^-$ állapotból nagyon kicsiny entalpia-változás ($\Delta H \approx 45$ meV) vezet a P^* elektron gerjesztett állapot (vissza-, illetve be-)népesítéséhez, míg ugyanez a folyamat a relaxált $P^+Q_A^-$ állapotból $\Delta H \approx 620$ meV entalpia-változást igényel. Mivel mindkét szint gyakorlatilag ugyanabban a mélységben van, azaz körülbelül ugyanakkora a szabadenergia-változás, ezért az entalpia-változásban megmutatkozó különbséget az entrópia-változás kompenzálja.

9. Inhibítorral gátolva a $Q_A^-Q_B$ és a $Q_AQ_B^-$ állapotok közötti elektrontranszfert a P^* állapothoz képest kisebb csapdamélységgel (és ezért nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitással) rendelkező $P^+Q_A^-$ állapot populációjának növekedését érjük el. Kromatofora esetében semleges pH-nál (pH = 7,0) a stigmatellin és a terbutrin inhibítorok hasonló viselkedését figyeltem meg, azaz mindkét gátlószer hatása telítésbe vihető megfelelően magas koncentráció alkalmazása esetén.
Alkalikus pH értékeknél (pH = 10,0) ezzel szemben a két inhibítor eltérő viselkedést mutatott: míg a terbutrin hatását telítésbe tudtam vinni, addig a stigmatellinnél ez nem volt elérhető még 50 μM inhibítor koncentrációnál sem. Detergensbe ágyazott reakciócentrumnál nem tapasztaltam ekkora mértékű eltérést a stigmatellin hatásában, különböző pH értékeknél.
A jelenség hátterében a reakciócentrumnak a membrán-környezettel kialakított speciális kölcsönhatása állhat. Magas pH-n ez a kölcsönhatás deformálhatja a másodlagos kinon kötőhely geometriáját, amely egyes inhibítoroknál (jelen esetben a stigmatellin) a stabilizációt szolgáló hidrogénhíd kötések felszakadását eredményezheti. Ez a kötési affinitás oly mértékű csökkenéséhez vezethet, amely az inhibítorral való telíthetőség megfigyelt elmaradását eredményezi. (III)

10. Meghatároztam az ubikinon-4 molekula parciális atomi töltéseit kinon és egyszeres negatív töltéssel rendelkező szemikinon állapotokra Mulliken-féle populáció-analízis segítségével gázfázisban (Mopac93 programcsomag felhasználásával), AM1 szemiempirikus kvantumkémiai szinten. A későbbi szimulációk során a meghatározott töltésértékeket használtam fel. A kiszámolt töltések az 1AIJ struktúrában [35] felvett geometriára vonatkoznak. (I)

11. Dokkolási szimuláció segítségével meghatároztam az ubikinon-4 molekula kötési szabadenergiáját az elsődleges kinon kötőhelyre vadtípusú és mutáns reakciócentrumok-

nál, kinon és szemikinon redox állapotokra. A vadtípus reakciócentrum fehérjének a röntgenkrisztallográfiai adatok alapján készített 1AIJ jelű struktúrát [35] használtam fel, és a mutáns reakciócentrumokat is ebből a szerkezetből kiindulva készítettem.
$\Delta G_{\text{kötési}}$ értékére vadtípus és kinon redox állapotra -13,11 kcal/mol-t kaptam, mely érték megegyezik a kísérleti adatokkal. M265IS, M265IV és M218MG mutánsoknál ennél negatívabb, míg M218MA és M265IT esetében ennél pozitívabb kötési szabadenergiát kaptam kinon állapotra. A Kísérleti adatok alapján a pozitívabb kötési szabadenergiák voltak a várhatóak. Szemikinon állapotban és szimmetrikus töltéseloszlásnál az M265IS mutáns kivételével minden mutánsra negatívabb kötési szabadenergia-értéket kaptam, mint a vadtípusú reakciócentrum esetében ($\Delta G_{\text{kötési}}$ = -15,29 kcal/mol).
A dokkolási szimulációval kapott kötési szabadenergia-értékek (kinon/szemikinon állapotra) felhasználásával meghatároztam az ubikinon-4 középponti redoxpotenciál-eltolódását a vadtípushoz képest a Q_A kötőhelyen (felhasználva, hogy az ubikinonmolekula középponti redoxpotenciálja víz oldószerben -145 mV [145]). Az eltolódások értékei csak részben mutattak egyezést a kísérleti eredményekkel. Az M218MA és M265IT mutánsok pozitív eltolódást, míg az M265IS negatív eltolódást mutatott mindegyik töltéseloszlásnál. (IV)

12. Szabadenergia perturbáció módszer segítségével modelleztem a kinon redukciójának folyamatát a fotoszintetikus reakciócentrumban. A perturbáció során a kinon atomi parciális töltéseit változtattam meg, hogy azok megfeleljenek a kinon, illetve az egyszeres negatív töltéssel rendelkező szemikinon állapotoknak. A perturbáció során a két állapot közötti szabadenergia-különbség értéket követtem nyomon. A szimulációt különböző töltéseloszlásoknál, valamint megelőző molekuladinamikai futtatást követően is elvégeztem.
Tekintve a kiindulási (kinon) és végállapot (szemikinon) közötti szabadenergia-különbséget, és annak eltolódási irányát a vadtípusnál kapott értékhez képest a legjobb közelítésnek a szimmetrikus töltéseloszlás, és megelőző molekuladinamikai szimuláció együttes használata mutatkozott. Ebben az esetben az eltolódási sor a vadtípushoz képest a következő volt: pozitív irány: M265IS, negatív irány: M265IV, M218MA és M265IT.
Megvizsgálva a kinonmolekula metoxi-csoportjainak nyílásszög-változását a redukció során, szembetűnő eltérést csak az M265IS és M218MA mutánsok esetében kaptam, mindkét esetben a C3-O3-C3H_3 metoxi-csoport nyilásszöge nőtt meg szemikinon állapotban (13-15 °-os változás). A kinon és környezete közötti hidrogénhíd kötések is megváltoznak a redox folyamat során. Minden esetben vagy a hidrogénhíd kötések számának növekedését, vagy a meglévő kötések kötéstávolságának csökkenését figyeltem meg. Ez egybevág a korábbi tapasztalattal, mely szerint az elsődleges kinon állapotát stabilizálja az elektron felvétele. (IV)

7. fejezet

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

I. **Rinyu L.**, Nagy L. and Körtvélyesi T.: The role of the electronic structure of quinones in the charge stabilization in photosynthetic reaction centers. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 571: 163-170, (2001).

II. **Rinyu L.**, Martin E.W., Takahashi E., Maróti P. and Wraight C.A.: Modulation of the free energy of the primary quinone acceptor (Q_A) in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: contributions from the protein and protein-lipid(cardiolipin) interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1655: 93-101, (2004).

III. Gerencsér L., **Rinyu L.**, Kálmán L., Takahashi E., Wraight C.A. and Maróti P.: Competitive binding of quinone and antibiotic stigmatellin to reaction centers of photosynthetic bacteria. *Acta Biologica Szegediensis*, 48(1-4): 25-33, (2004).

IV. **Rinyu L.**, Körtvélyesi T. and Maróti P.:Molecular dynamics approach to energetics of primary quinone in bacterial reaction centers. kézirat (beküldésre előkészítve).

Egyéb publikációk

1. **Rinyu L.**, Méray N., Tandori J., Pfeiffer I., Maróti P., Nagy L.: Steric and electrostatic effects on the stabilization of the secondary quinone in reaction centers. Photosynthesis: Mechanism and effects. Proceedings of 11th International Congress on Photosynthesis. Budapest, Hungary, 17-22 Aug., 1998. Szerk.: G. Garab. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 833-, (1998).

2. Nagy L., Fodor E., Tandori J., **Rinyu L.**, Farkas T.: Lipids affect the charge stabilization in wild-type and mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 465- , (1999).

3. Halmschlager A., Tandori J., Trotta M., **Rinyu L.**, Pfeiffer I., Nagy L.: A mathematical model for quinone-herbicide competition in the reaction centres of *Rhodobacter sphaeroides*. *Functional Plant Biology* 29: 433-, (2002).

4. Molnár M., Joó K., Barczi A., Szántó Zs., Futó I., Palcsu L., **Rinyu L.**: Dating of total soil organic matter used in kurgan studies. *Radiocarbon* 46: 413-, (2004).

5. Molnár M., Szántó Zs., Svingor É., Palcsu L., Futó I., **Rinyu L.**: Gas generation measurements in drums containing LL/ILW. Waste Management, Energy Security and a Clean Environment. WM 04 Conference. Tucson, Arizona, Feb. 29 - March 4, 2004. Proceedings. Tucson, WM Symphosia Inc. 0: 204-, (2004).

6. Palcsu L., Svingor É., Szántó Zs., Molnár M., Futó I., Major Z., **Rinyu L.**: Isotopic composition of precipitation in Hungary in 2001 and 2002. International Symposium on Isotope Hydrology and Integrated Water Resources Management. Vienna, Austria, 19-23 May, 2004. Proceedings. Vienna, IAEA 0: 306-, (2004).

7. Molnár M., Palcsu L., Svingor É., Futó I., Major Z., **Rinyu L.**, Veres M.: Isotope-analytical results of a study of gas generation in L/ILW. *Czechoslovak Journal of Physics* 56: 637-, (2006).

8. Szántó Zs., Svingor É., Futó I., Palcsu L., Molnár M., **Rinyu L.**: A hydrochemical and isotopic case study around a near surface radioactive waste disposal. *Radiochimica Acta* 95: 55-, (2007).

9. **Rinyu L.**, Futó I., Kiss Á.Z., Molnár M., Svingor É., Quarta G., Calcagnile L.: Performance test of a new graphite target production facility in ATOMKI. *Radiocarbon*, kézirat elfogadva. (2007).

Könyvfejezet

Svingor É., Molnár M., Palcsu L., Futó I., Major Z., **Rinyu L.**, Szántó Zs., Barnabás I.: Monitoring vizsgálatok a Püspökszilágyi radioaktív hulladék kezelő és tároló környezetében. (in Hung.) Magyarország környezetkémiai állapota. Szerk.: Szendrei G. Bp., Innova Print Kft 161-, (2006).

8. fejezet

Summary

8.1. Introduction

Photosynthesis is one of the basic metabolic processes of the living organisms. Photosynthesizing species (bacteria, algae and higher class plants) convert the energy of light into other forms of free energy (redox potential, electrochemical potential of ions and protons and phosphate-potential) which are directly suitable either to cover the energy need of the vital processes of the cell or to storage. The ultimate free energy of the photosynthetic organisms is the radiation of the sun that serves as energy source not only for themselves, but, indirectly, for other living organisms (e.g. animals and human mankind), as well. Thus, the photosynthetic species supply the nutrient source for all other living creatures up to the top-predators being at the end of the food chain. Photosynthetic processes can basically be divided into two main categories: light reactions and dark reactions. In the light reactions, sources of the dark reactions are generated (ATP and reduced coenzymes) making possible the production of high-energy carbohydrates via the succession of different biochemical metabolic processes (dark reactions). Light reactions proceed after the absorption of the photon with the contribution of specifically oriented pigments embedded into proteins (pigment-protein complexes). In green plants, where photosynthesis occurs in the most effective way known so far, NADPH and ATP are generated in the course of the light reactions. In this process, two photochemical systems (PSI and PSII) contribute which are well-separated from each other. The water evolving complex connecting to the PSII is uniquely able to decompose the water to protons and molecular oxygen driven indirectly by light. A significant part of the absorbed light energy is stored in the form of proton electrochemical potential that is formed by succession of a series of redox reactions. The transmembrane protonmotive force is the energy source of ATP synthesis. The other part of the absorbed light energy by PSII gets on the PSI completing the process with the absorption of another photon by PSI, resulting in the reduction of the NADP.

The processes of photosynthetic energy conversion in bacteria are considerably more simple than in higher-class green plants. In bacteria, contrary to green plants, only one photochemical system (including the light harvesting antennas and the reaction center protein-pigment complex) operates. As opposed to the linear, partly cyclic electron transport-chain of green plants, the bacterial one is made up of only one cycle, in the course of which the charge couple generated in the reaction center gets stabilized. The reaction center of non-sulfur purple bacteria is similar to the PSII photochemical system of higher plants. Following the absorption of light by the bacteriochlorophyll dimer (P) of the reaction center gets into an excited singlet state (P^*). The energy gap between the ground and the excited states equals to the energy of the absorbed photon, which is 1380 meV in the case

of *Rhodobacter sphareoides* [1]. The carrying of electron from the primary donor to the bacteriopheophytin (Bpheo) is facilitated by the bacteriochlorophyll monomer with the overlapping of the electron clouds of the primary donor and the acceptor bacteriopheophytin. Hereby, the electron gets to the primary quinone by direct tunneling process with the help of the nuclear vibration of the peptide skeleton and the bridging residues (the M252 tryptophan and the M218 methionine [2, 3]). More than 98 % of photon-absorbing reaction centers get into this state, i.e. the quantum-efficiency of photosynthesis is nearly unit. Contrary to this, the energy efficiency of light utilization is much lower, only 30-40 %, as 60-70 % of the energy is lost via the transport of the electron between the cofactors of the protein. The process with the highest energy loss is the reduction of the primary quinone (Q_A). However, this step is important in the irreversible rendering of the charge-separation *in vivo*.

The reaction center of the *Rhodobacter sphaeroides* purple bacteria besides the primary quinone contains another quinone molecule (secondary quinone, Q_B). The two quinones are identical from chemical point of view (both are UQ_{10}), however, they differ in redox and binding properties [4]. It is due to the different protein environment [5]. The primary quinone is located in a strongly hydrophobic environment and one of the protein subunits of the reaction center (H-subunit) isolates it from the aqueous phase. Due to this environment, the quinone is not able to accept a proton after the reduction. Under physiological circumstances, Q_A can be reduced only by one electron, and its doubly reduced form can be observed only at extreme high light intensity and under strongly reducing circumstances [6]. It is able to form several hydrogen bounds with the surrounding amino acids and structure waters, consequently binds to the reaction center very strongly and can be removed only by drastic treatment [7]. Its semiquinone form is rather stable, the free energy change accompanied with the reduction is considerably more positive at the Q_A binding site, than in apolar solvents [9, 62]. The midpoint redox potential of the Q_A/Q_A^- redox couple is influenced not only by the steric and electrostatic interactions with the surrounding proteins, but by the interactions between reaction center-protein and lipid-membrane, as well.

In contrary to the primary quinone, the protein environment of the secondary quinone contains several polar amino acids, whose electric field decreases the energy of the Q_B/Q_B^- redox couple. The quinone form is bound loosely to the reaction center and can be separated easily, or substituted with an inhibitor (e.g. o-phenanthroline, terbutrine, stigmatelline) [8]. Its semiquinone form is also very stable, it has 10^{12} times longer lifetime in the reaction center than in solution [9]. The midpoint redox potential of the Q_B/Q_B^- couple *in vivo* is 60 mV higher than that of the Q_A/Q_A^- couple at pH 8.0 [10]. The complete reduction of the secondary quinone can proceed in the reaction center: the reduction by two electrons is coupled to uptake of two protons. The generated dihydro-quinol separates from the reaction center protein easily and is replaced by one of the free quinones of the membrane [9, 11].

In addition to the photochemical reaction, the excited dimer can return to the ground state by photon emission, as well. The light emission of the bacterial reaction can occur either by prompt or delayed fluorescence. As both forms of emission originate from P^*, they cannot be separated spectrally. However, their decay times and intensities are significantly different. While the prompt fluorescence decays in a few nanoseconds after the excitation, the delayed fluorescence can be observed in a much more extended time domain due to the slow back reactions ($P^+Bpheo^- \rightarrow P^*Bpheo$, $P^+Q_A^- \rightarrow P^*Q_A$ and $P^+Q_B^- \rightarrow P^*Q_B$) of the precursors [12]. The intensity of the delayed fluorescence is several orders of magnitudes lower than that of the prompt fluorescence. The rate constant of decay of the delayed fluorescence equals to that of the disappearance of the charge-separated state by charge

recombination, which proves that the delayed fluorescence originates from leakage type process [13]. Based on the intensity of the delayed fluorescence in the millisecond range relative to that of the prompt fluorescence, the free energy level of the $P^+Q_A^-$ charge-separated state relative to the free energy level of the excited dimer can be determined [14]. This is a special and unique feature of the delayed fluorescence as other methods can hardly give the chance of direct determination of the free energy gap. In addition, the sensitivity of the method based on measurement of delayed fluorescence is surprisingly high. I tried to utilize these advantages of the millisecond delayed fluorescence by systematic modification of several factors that determine the midpoint redox potential of the primary quinone. The application of combined methods (mutation, delayed fluorescence and model calculations) to the primary quinone opened the stage for widespread structural and functional studies of the reaction center protein.

8.2. Aims

The most important aim of this study was the design and production of reaction center mutants in the binding pocket of the primary quinone to investigate the effect of the amino acids of the protein and lipids of the membrane on the thermodynamics of the primary quinone. The first priority will be the determination of the absolute free energy gap between the P^* and the $P^+Q_A^-$ states in wild type and mutant reaction centers by comparison of the intensities of prompt and delayed fluorescence emitted by the primary donor of the reaction center. By use of the values of the free energy gaps, I'll determine the in situ midpoint redox potential of the Q_A/Q_A^- redox couple in the mutants.

The reaction center structure with atomic resolution determined by X-ray diffraction study makes possible to calculate the thermodynamic properties of the mutants with computer simulations. Using docking simulations in wild-type and mutant reaction centers, I will calculate the binding free energies of the quinone and semiquinone molecules, and I will estimate the midpoint redox potential of the Q_A/Q_A^- redox couple. Additionally, by use of the free energy perturbation method, I will model the reduction process of the primary quinone molecule in wild-type and mutant reaction centers.

With the application of cardiolipin (diphosphatide-glycerol), as model-lipid I will investigate the interaction between the reaction center protein and the lipid-environment. I'm curious how does it affect the charge-recombination process and how does it influence the free energy level of the charge couple ($P^+Q_A^-$) relative to the energy level of the excited primary donor.

With the investigation of the delayed fluorescence of the reaction center embedded into membrane fragment (chromatophore) I will get further information about the effects of reaction center proteins and lipid membranes on the Q_A. In addition to these studies, I will characterize the complex kinetics of the decay of the delayed fluorescence emitted by chromatophore and special attention will be paid to the fastest kinetic component.

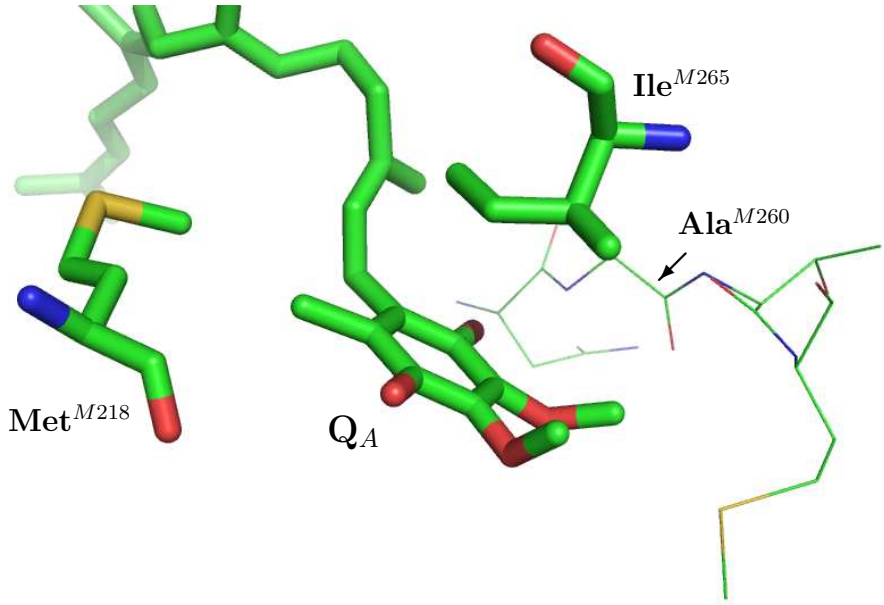
8.3. Materials and methods

Bacterial strains:

- *Rhodobacter sphaeroides* **R-26** blue-green, carotenoidless strain as wild type,
- *Rhodobacter sphaeroides* **GA** green, carotenoid-containing strain as wild type, and mutant strains are made by site-directed mutations of the Q_A site in GA wild type:

- **M265IV** Ile^{M265} → Val apolar mutant.
- **M265IS** Ile^{M265} → Ser polar mutant.
- **M265IT** Ile^{M265} → Thr polar mutant.
- **M218MA** Met^{M218} → Ala mutant.
- **M218MG** Met^{M218} → Gln mutant.

- CYCA1 cytochrome c_2-deficient derivative of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 wild-type strain.



8.1 ábra Protein environment of the primary quinone (Q_A) in wild-type reaction centers. Met^{M218} and Ile^{M265} side chains are shown by sticks. The M259-M262 segment is shown by lines. The figure is drawn and rendered by PyMOL. The coordinates are from 1AIJ [35] for R26 reaction centers.

Standard protein purification methods were used to isolate the reaction centers of the non-sulfur purple photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: the bacterial cells were disrupted by ultrasonic treatment, membrane fragments (chromatophores) were obtained by ultra-centrifugation, and the reaction centers were solubilised by LDAO detergent and ammonium sulfate. The purification of the reaction centers were purified by DEAE-Sephacell ion-exchange chromatography.

The purified mutant reaction centers arrived in frozen state from the group of Prof. Colin A. Wraight (Uversity of Illinois, Biophysics and Plant Biology Center for Biophysics and Computational Biology, Urbana-Champaign, USA).

8.3.1. Measurement of flash-induced absorption change

The concentration of the reaction center and the charge recombination kinetics were determined from the flash-induced absorption changes of the primer donor (P) at 430 nm and

605 nm in isolated reaction centers and chromatophores, respectively. The measurements were carried out with a homemade single-beam spectrophotometer [69].

8.3.2. Measurement of delayed and prompt fluorescence

The kinetics of the millisecond delayed fluorescence of the reaction center after single flash excitation was measured with a homemade fluorometer [117]. The major difficulties arose from the extremely low yield of delayed fluorescence (in the range of 10^{-9}), the near-infrared emission wavelength (the maximum of fluorescence is centered at 920 nm), and the intense of the prompt fluorescence emitted during excitation. The reaction center was excited by a frequency-doubled and Q-switched Nd:YAG laser flash (Quantel YG 781-10, wavelength 532 nm, energy 100 mJ and duration 5 ns). The laser beam was introduced into a light-tight box through a green-filter (Schott BG-18). The sample was in a thermostated 1 cm rectangular quartz cuvette selected for extremely low fluorescence ("far UV"; Thermal Syndicate Ltd.). The fluorescence of the reaction center was focused through an infrared cutoff filter (Schott RG-850) onto the photocathode of a red-sensitive photomultiplier (Hamamatsu R-3310-03). Temperature of the sample was measured with K-type (NiCr-Ni) digital thermometer (Vermer VE 305K).

256 and 128 trace of the delayed fluorescence kinetics were averaged in isolated reaction center and chromatophore, respectively. The signals were collected, stored and analyzed with a personal computer.

8.3.3. Calculation of free energy drop from $\mathbf{P^*}$ to $\mathbf{P^+Q_A^-}$

The free energy gap between P^* and $P^+Q_A^-$ states (ΔG_{P^*A}) was calculated by comparison of the delayed and prompt fluorescence yields according to Arata and Parson [14]. The Q_B binding packet was blocked with inhibitor during experiments. The integral intensities of delayed and prompt fluorescence were measured in the same sample (contained isolated reaction centers) but at very different excitation intensities (both in the linear region) to give similar emission intensities. The integrated intensity of the delayed fluorescence was determined by a one-exponential fit to the decay of the delayed fluorescence signal; the integrated intensity of prompt fluorescence was determined by electronic integration of the prompt fluorescence, using a time constant (1 ms) similar to that of the delayed fluorescence decay time. If the integrated fluorescence intensities were takes as the product of the amplitude and decay time of fitted curves, we get the following expression:

$$\Delta G_{P^*A} = k_B T \cdot ln(\frac{\phi_f}{k_f \cdot \phi_p} \cdot \frac{A_{\mathrm{kf}} \cdot \tau_{\mathrm{kf}}}{A_p \cdot \tau_p} \cdot t_{\mathrm{filter}}), \tag{8.1}$$

where k_B is the Boltzmann-constant, T is the temperature, ϕ_f is the prompt fluorescence yield of P^* in reaction centers ($4.0 \pm 1.5 \cdot 10^{-4}$), k_f is the radiative rate constant for reaction center bacteriochlorophyll ($\approx 8 \cdot 10^7 s^{-1}$, from Strickler-Berg relationship [119]), ϕ_p is the quantum yield of charge separation (0.98 ± 0.04), A is the amplitude, τ is the lifetime of the fitted curves, and t_{filter} is the transmission of the glass plate and the gray filter were used in case of prompt fluorescence measurement.

8.3.4. Computer simulations

The mutant reaction centers were made of employment of 1AIJ structure [35] with mutagenesis module of the PyMol software package [144].

The atomic partial charges of the ubiquinone-4 molecule in states of quinone and semiquinone were determined by Mulliken population analysis, at the level of the semi empirical quantum chemical method AM1 implemented in Mopac93 [143].

Molecular dynamics and free energy perturbation simulations were carried out with Q-package (developed by Johan Åqvist and coworkers) [147].

The docking simulations of the quinone molecules to the reaction center protein were carried out with AutoDock 3.0.5 [154]. The input files were prepared with AutoDockTools software-package.

8.4. New results

1. The free energy drops from P* to $P^+Q_A^-$ were determined from the ratio of the intensities of the delayed and prompt fluorescence of bacteriochlorophyll dimer of *Rhodobacter sphaeroides* GA wild-type and Q_A site mutants isolated reaction centers in the physiological pH range. The standard free energy of the primary stable charge pair ($P^+Q_A^-$) relative to that of the excited dimer at pH 8.0 was found to be -890 ± 5 meV with native ubiquinone-10 as Q_A, in the absence of any secondary quinone, for GA wild-type. (II)

2. M265IV mutant reaction centers exhibited almost unaltered delayed fluorescence, compared to GA wild-type, in the physiological pH range, but with a somewhat flatter pH dependence. The ΔG_{P^*A} was found to be -890 ± 10 meV at pH 8.0 for M265IV mutant reaction centers, which was in a good agreement whit the value of GA wild-type at the same pH. At pH 10.5, ΔG_{P^*A} for M265IV reactions centers was 20 meV more negative than for GA wild-type reaction centers, because of the different pH dependency. (II)

3. The two M265 polar mutants (M265IS and M265IT) gave substantially higher delayed fluorescence emission intensity than GA wild-type reaction centers at the physiological pH range, indicating a much smaller energy gap between P* and $P^+Q_A^-$. The ΔG_{P^*A} was found to be -830 ± 10 meV for M265IS and -775 ± 5 meV for M265IT at pH 8.0. Compared to wild-type reaction centers, these values correspond to shifts in the midpoint redox potential (E_m) of Q_A of -60 mV and -115 mV, respectively.
   Based on the available data of reaction center structures and the former FTIR studies, the following explanation is given to this phenomena: The substantial change in E_m of Q_A seen in the polar M265 mutants arises from subtle changes in the length of the hydrogen bonds from quinone environment to quinone carbonyls. It was proposed that the hydroxyl group of serine and threonine side chains is hydrogen bonded to the peptid carbonyl of Thr^{M261}, pushing away the extended backbone region of M259-M262. The Ala^{M260} also moves away from the primary quinone, which residue resides within hydrogen bond length from Q_A in wild-type reaction centers. The transformed environment and the rearrangement of hydrogen bonds (which is stabilized the quinone) were caused the altering of the redox properties of the primary quinone. (II)

4. The M218MA and the M218MG mutants also gave substantially higher delayed fluorescence emission intensity than wild-type reaction centers at the physiological pH range. The ΔG_{P^*A} was found to be -835 ± 20 meV for M218MA and -805 ± 10 meV for M218MG at pH 8.0. These values indicate E_m shifts for Q_A of -55 mV and -85 mV, respectively. Both M218 mutants showed qualitatively similar pH dependencies

to those of GA wild-type and the M265 mutants.
In the absence of a secondary donor to re-reduced P^+, back reaction of the charge-separated state, $P^+Q_A^-$, was monitored as P recovery at 430 nm. In wild-type reaction centers, the apparent rate constant (k_P^A) is about 9 s^{-1}, at room temperature. In both M218 mutants this rate was accelerated: $k_P^A = 27$ s^{-1} for M218MA, and $k_P^A = 38$ s^{-1} for M218MG. In the wild-type, with ubiquinone-10 as Q_A, the recombination process is by direct tunneling from Q_A^- to P^+ [139]. However, as the redox potential of Q_A is lowered, e.g., by mutation, a thermally activated route via P^+Bpheo^- becomes accessible. The accelerated back reaction process is the unambiguous sign that the thermally activated route turns on.
The structural basis for the substantial effect of the M218 mutations is not known at this time. The substituted residues, alanine and glycine, are very much smaller than the native methionine, which closes off one side of the Q_A pocket and contributes to the packing between Q_A and $Bpheo_A$. Beside the methionine the Thr^{M252} also acts as a direct tunneling route to the Q_A for electrons to reduce the primary quinone [2, 3]. It is possible that the small side chain volume of the mutant residues allows sequestration of one or more water molecules close to the quinone. The E_m shifts in these mutants with anthraquinone as Q_A is significantly smaller than for the native ubiquinone (basis on recombination kinetics measurements). This might indicate that the large anthraquinone moiety fills more of the available space than does ubiquinone. (II)

5. Addition of cardiolipin to isolated reaction centers in detergent suspension caused a significant slowing of the back reaction (charge recombination) of $P^+Q_B^-$. The effect showed half saturation at about 10 - 20 μM cardiolipin. Since the major route for recombination is via the $P^+Q_A^-$ state [63, 81, 141], this is indicative of a large equilibrium constant for the one electron transfer, $Q_A^-Q_B \leftarrow Q_AQ_B^-$. With 100 μM cardiolipin, at pH 8.0, the slowing was approximately 3-fold, consistent with a 30 meV increase in the free energy drop from Q_A^- to Q_B. The effect was constant across the pH range, from pH 6 to 10.5. The relative amplitude of the slow phase of the back reaction also increased from 70 % to >90 % in the presence of cardiolipin, indicating a substantial increase in the functional occupancy of the Q_B site.
The intensity of delayed fluorescence from wild-type reaction centers with inhibited by terbutrin, was increased 5 - 7-fold in the presence of cardiolipin. Comparison of the integrated intensities showed the magnitude of ΔG_{P^*A} to decrease by 30 $\pm$ 10 meV. The increased delayed fluorescence yield from $P^+Q_A^-$ and slowing of the $P^+Q_B^-$ back reaction by low levels of cardiolipin show that this lipid lowers the E_m of Q_A by 30 - 40 mV. (II)

6. Upon identical reaction center concentrations in chromatophore and in detergent suspension, the intensity of the delayed fluorescence is two order of magnitudes higher in chromatophore than in micelles. The possible reason of this behaviour is the different environment of the reaction centers in the two media. The protein in micellar solution forms weak interactions with the disordered detergent molecules. On the other hand in membrane fragments, the interaction between the reaction center protein and the lipid molecules becomes dominant and shifts the midpoint redox potential of the primary quinone.
We have seen in the previous point, that the mutation of the Q_A site residues caused significant shifts in the midpoint redox potential of the Q_A/Q_A^- redox couple. If this shifts occurs to the negative directions, the delayed fluorescence intensity increases

exponentially. We found the same effect in case of interaction of the cardiolipin molecules and reaction centers, which was a good approach of the native membrane environment. Based on numerous similar experiments, the native membrane could shift the midpoint redox potential of the Q_A/Q_A^- redox couple by 100 mV to negative direction compared to detergent suspension. I draw the conclusion from these facts that the interaction between the redox center of the reaction centers and the native membrane lipids is one of the major factors which caused the observed change in delayed fluorescence intensity.

7. I observed that the delayed fluorescence intensity decreased by one-two orders of magnitudes, while the prompt fluorescence intensity increased 2-3-fold during titration of zwitterionic detergent (LDAO) to chromatophore. In chromatophore, in contrast to isolated reaction centers, there is tight cooperation between the light harvesting systems and the reaction center protein in addition to the reaction center-membrane-lipid interaction. While in isolated reaction centers the delayed fluorescence originates from the bacteriochlorophyll dimer, in chromatophore the precursor of the delayed fluorescence can be an antenna bacteriochlorophyll, as well. Here the P^* state (which is formed during the back reaction) may delocalize in the antenna complex via very efficient the energy-(exciton) transfer from the reaction centers. If this occurs then the photon is emitted by one of the antenna-pigments, and the emission yield can be different from that of the dimer in the reaction center.
   The increase of the concentration of the LDAO causes the weakening of the cooperation between reaction centers and antenna-system and can finally break it up. The experimental results show that the yield of the fluorescence depends on the location of disappearance (deactivation) of the electron excited state (exciton): it can happen either in the bacterioclorophyll dimer of the reaction center or in the antenna system. Based on the LDAO titration experiments, the yield of the fluorescence in the antenna system is smaller than in the dimer of the reaction centers.

8. Upon inhibition of the electron transfer between the Q_A and Q_B, I found a new and fast (lifetime $\approx$ 10 ms) component in the milliseconds delayed fluorescence kinetics of chromatophore, in addition to the slow component (lifetime $\approx$ 100 ms), which represents the $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ back reaction. I could not find component of equivalent lifetime neither in absorption change kinetics of oxidized dimer, nor in millisecond delayed fluorescence kinetics of isolated reaction centers. The simplest explanation of this new component could be related to the not complete relaxation of the $P^+Q_A^-$ state in the (sub)millisecond time range. I argue for a hot transient state (it is not relaxed) of the charge separated state ($P^+Q_A^-$) and the protein environment. The relaxation of this transient state needs long time. The reason why we can not make distinction between the two components in absorption is that the relaxed and unrelaxed states both belong to the same redox state. Thus, the hot transient state is "silent" in absorption kinetics, but not in delayed fluorescence kinetics.
   The fast and the slow components of delayed fluorescence behave similarly under numerous treatments. The free energies of the two states showed similar dependency on pH, detergent (LDAO) concentration, actual redox potential or concentration of external electron donors (ferrocene and TMPD). The similar behaviour to these treatments indicates that the two components might have common origin, i.e. they reflect the same redox state but different vibrational state of the primary charge pair. The latter property is supported by the different temperature dependence of the components. The van't Hoff plots of the different components reveals that the

process is entropy- and enthalpy-driven in the fast and slow component, respectively: small enthalpy-change ($\Delta H \approx 45$ meV) describes the back reaction from the non-relaxated $P^+Q_A^-$ state to the P^* electron excited state, while the same process needs much larger enthalpy-change ($\Delta H \approx 620$ meV) from the relaxed $P^+Q_A^-$ state. Because the free energy levels of the two states are very close to each other, the difference in enthalpy-change is compensated by entropy-change.

9. By block of the electron transfer between $Q_A^-Q_B$ and $Q_AQ_B^-$ with an inhibitor, the population of $P^+Q_A^-$ charge separated state and therefore the intensity of delayed fluorescence will increase. Stigmatellin and terbutrin inhibitors tested on chromatophores at neutral pH (pH = 7.0) were found to act similarly. The effect could be saturated by high enough concentrations.
   In contrast, at alkaline pH (pH = 10.0) the inhibitors showed different behaviour: the effect of terbutrin could be saturated but stigmatelline (even at high concentrations as 50 μM) not. For reaction centers solubilized in detergent, this large different was not present. To explain this behaviour, we have to assume special interactions of reaction centers with its surroundings. The interactions can deform the geometry of the secondary quinone binding site at high pH values leading to break of hydrogen bridge bonds that have important role in stabilization of the inhibitor (e.g. stigmatellin). This process can result in efficient decrease of binding affinity and can cause the observed loss of activity of the inhibitor. (III)

10. The atomic partial charges of the ubiquinone-4 molecule were determined in two redox states (quinone and semiquinone) by Mulliken population analysis, at the level of the semi empirical quantum chemical method AM1 implemented in Mopac93 [143]. The atomic partial charges relate to the geometry of the ubiquinone molecule is described in the 1AIJ structure [35]. The determined charges were used in the subsequently simulations. (I)

11. The binding free energies for ubiquinone-4 molecule to primary quinone binding site in reaction center protein was determined by docking simulation in two redox states (quinone and semiquinone) of the quinone. 1AIJ structure [35] was the initial geometry of the wild-type reaction center protein and it was the basis of the construction of the mutants structures.
    The ΔG_{bind} of the quinone state was found to be -13.11 kcal/mol for wild-type which is in the good agreement with the experimental data [61]. The binding free energies were more negative for M265IS, M265IV and M218MG mutants and more positive for M218MA and M265IT mutants than wild-type in case of quinone state. More positive values were expected based on the experimental data. The ΔG_{bind} of the semiquinone state was -15.29 kcal/mol in symmetrical charge distribution for wild-type reaction center and all mutants gave more positive values except of M265IS.
    By use of these binding free energies and the midpoint redox potential of ubiquinone in water solvent (-145 mV [145]), I calculated the shifts of the midpoint redox potential of Q_A/Q_A^- redox couple for mutants reaction centers compared to wild-type. The tendency of these shifts showed partial agreement with the experimental results. The midpoint redox potential of the primary quinone was shifted in positive direction for M218MA and M265IT mutants, and in negative direction for M265IS independently what charge distribution in semiquinone state was used. (IV)

12. The reduction of the primary quinone in reaction center protein was modeled by free energy perturbation method (FEP). The change of the atomic partial charges during

the reduction process (quinone gradually turns to semiquinone) was considered as perturbation. I followed the free energy gap between the two states (Q_A and Q_A^-) in the course of simulation process for different charge distribution of the semiquinone and in case of different types of starting geometry (with or without previous molecular dynamics simulation).
I got the best agreement with experimental data when I used symmetrical charge distribution of semiquinone and the geometries were equilibrated by previous molecular dynamics. In this case the shifts of the midpoint redox potential of the Q_A/Q_A^- redox couple compared to wild-type was the following: M265IS (positive direction), and in the negative direction: M265IV, M218MA and M265IT.
The angle of the methoxy-groups of the quinone molecule changed only in two strains (M265IS and M218MA mutants) during the reduction process. The changes of the angle of C3-O3-$C3H_3$ methoxy-group were 13 - 15° in both case. Changes were observed also in the number and in the length of the hydrogen bonds formed between the quinone molecule and the protein/water environments during the reduction process. I found, that the reduction process increased the number of the hydrogen bonds and/or decreased the length of the bonds. This behaviour is in fair agreement with the experimental observations, that the state of primary quinone is stabilized by the acceptance of the electron. (IV)

Irodalomjegyzék

[1] S.C. Straley, W.W. Parson, D.C. Mauzerall, és R.K. Clayton. Pigment content and molar extinction coefficients of photochemical reaction centers from *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 305(3):597–609, 1973.

[2] T. Kawatsu, T. Kakitani, és T. Yamato. Destructive interference in the electron tunneling through protein media. *J. Phys. Chem. B*, 106(43):11356–11366, 2002.

[3] H. Nishioka, A. Kimura, T. Yamato, T. Kawatsu, és T. Kakitani. Interference, fluctuation, and alternation of electron tunneling in protein media. 1. Two tunneling routes in photosynthetic reaction center alternate due to thermal fluctuation of protein conformation. *J. Phys. Chem. B*, 1095(5):1978–1987, 2005.

[4] R.C. Prince, P.L. Dutton, és J.M. Bruce. Electrochemistry of ubiquinones: Menaquinones and plastoquinones in aprotic solvents. *FEBS Letters*, 160(1,2):273–276, 1983.

[5] J.P. Allen, G. Fehér, T.O. Yeates, H. Komiya, és D.C. Rees. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: Protein-cofactor (quinones and Fe^{2+}) interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8487–8491, 1988.

[6] M.Y. Okamura, R.A. Isaacson, és G. Fehér. Spectroscopic and kinetic properties of the transient intermediate acceptor in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 546:394–417, 1979.

[7] M.Y. Okamura, R.A. Isaacson, és G. Fehér. Primary acceptor in bacterial photosynthesis: Obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3491–3495, 1975.

[8] I. Sinning. Herbicide binding in the bacterial photosynthetic reaction center. *Trends in Biol. Sci.*, 17:150–154, 1992.

[9] A.R. Crofts és C.A. Wraight. The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 726:149–185, 1983.

[10] A.W. Rutherford és M.C.W. Evans. Direct measurement of the redox potential of the primary and secondary quinone electron acceptors in *Rhodopseudomonas sphaeroides* (wild-type) by EPR spectrometry. *FEBS Letters*, 110(2):257–261, 1980.

[11] P.H. McPherson, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Electron transfer from the reaction center of *Rb. sphaeroides* to the quinone pool: doubly reduced Q_B leaves the reaction center. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1016:289–292, 1990.

[12] R.K. Clayton. *Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns.* Cambridge University Press, Cambridge, 1980.

[13] S. Malkin. Delayed luminescence. In J. Barber (szerk.): *Primary Processes of Photosynthesis* (konferenciaanyag), 349-431 old. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1977.

[14] H. Arata és W.W. Parson. Delayed fluorescence from *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers enthalpy and free energy changes accompanying electron transfer from P-870 to quinones. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 638:201–209, 1981.

[15] G. McDermott, S.M. Prince, A.A. Freer, A.M. Hawthornthwaite-Lawless M.Z. Papiz, R.J. Cogdell, és N.W. Isaacs. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature*, 374(6522):517–520, 1995.

[16] A.A. Freer, S.M. Prince, K. Sauer, M.Z. Papiz, A.M. Hawthornthwaite-Lawless, G. McDermott R.J. Codgell, és N.W. Isaacs. Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas acidophila. Structure*, 4(4):449–462, 1996.

[17] J. Koepke, X. Hu, C. Muencke, K. Schulten, és H. Michel. The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800850) from *Rhodospirillum molischianum. Structure*, 4(5):581–, 1996.

[18] A.W. Roszak, T.D. Howard, J. Southall, A.T. Gardiner, C.J. Law, N.W.Isaacs, és R.J. Cogdell. Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodopseudomonas palustris. Science*, 302:1969, 2003.

[19] X. Hu, T. Ritz, A. Damjanovic, és K. Schulten. Pigment organization and transfer of electronic excitation in the photosynthetic unit of purple bacteria. *J. Phys. Chem. B*, 101:3854–3871, 1997.

[20] M.Z. Papiz, S.M. Prince, A.M. Hawthornthwaite-Lawless, G. McDermott, A.A. Freer, N.W. Isaac, és R.J. Codgell. A model for the photosynthetic apparatus of purple bacteria. *Trends in Plant Science*, 1(6):198–206, 1996.

[21] R. Emerson és W. Arnold. The photochemical reaction in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.*, 16(2):191–205, 1932.

[22] L.N.M. Duysens. Ph.D. értekezés, University of Utrecht, 1952.

[23] R.K. Clayton és R.T. Wang. Photochemical reaction centers from *Rhodopseudomonas spheroides. Methods in Enzymology*, 23:696–704, 1971.

[24] G. Fehér. *Photochem. Photobiol.*, 14:373–387, 1971.

[25] H. Michel. Three-dimensional crystals of a membrane protein complex : The photosynthetic reaction centre from *Rhodopseudomonas viridis. Journal of Molecular Biology*, 158(3):567–572, 1982.

[26] J. Deisenhofer, O. Epp, I. Sinning, és H. Michel. Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodopseudomonas viridis. Journal of Molecular Biology*, 246(3):429–457, 1995.

[27] J. Deisenhofer és H. Michel. Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. *The EMBO journal*, 8:2149–2169, 1989.

[28] J. Deisenhofer, O. Miki, R. Huber, és H. Michel. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 318(6047):618–624, 1985.

[29] A.J. Chirino, E.J. Lous, M. Huber, J.P. Allen, C.C. Schenck, M.L. Paddock, G. Fehér, és D.C. Rees. Crystallographic analyses of site-directed mutants of the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 33:4584–4593, 1994.

[30] A. Kuglstatter, U. Ermler, H. Michel, L. Baciou, és G. Fritzsch. X-ray structure analyses of photosynthetic reaction center variants from *Rhodobacter sphaeroides*: Structural changes induced by point-mutations at position L209 modulate electron and proton transfer. *Biochemistry*, 14:4253–, 2001.

[31] P.R. Pokkuluri, P.D. Laible, Y.L. Deng, T.N. Wong, D.K. Hanson, és M. Schiffer. The structure of a mutant photosynthetic reaction center shows unexpected changes in main chain orientations and quinone position. *Biochemistry*, 41:5998–, 2002.

[32] Q. Xu, H.L. Axelrod, E.C. Abresch, M.L. Paddock, M.Y. Okamura, és G. Fehér. X-ray structure determination of three mutants of the bacterial photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*; Altered proton transfer pathways. *Structure*, 12:703–, 2004.

[33] A. Camara-Artigas, D. Brune, és J.P. Allen. Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:11055–, 2002.

[34] H.L. Axelrod, E.C. Abresch, M.L. Paddock, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd^{2+} and Zn^{2+} in bacterial reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:1542–, 2000.

[35] M.H. Stowell, T.M.McPhillips, D.C. Rees, S.M. Soltis, E. Abresch, és G.Fehér. Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: Implications for mechanism of electron-proton transfer. *Sciences*, 276(5313):812–816, 1997.

[36] J.C. Williams, L.A. Steiner, G. Fehér, és M.I. Simon. Primary structure of the L subunit of the reaction center from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:7303–7307, 1984.

[37] G. Fehér, J.P. Allen, M.Y. Okamura, és D.C. Rees. Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centers. *Nature*, 339:111–116, 1989.

[38] H. Michel, K.A. Weyer, H. Gruenberg, I. Dunger, D. Oesterhelt, és F. Lottspeich. The 'light' and 'medium' subunits of the photosynthetic reaction centre from *Rhodopseudomonas viridis*: isolation of the genes, nucleotide and amino acid sequence. *The EMBO Journal*, 5:1149–1158, 1986.

[39] J.C. Williams, L.A. Steiner, és G. Fehér. Primary structure of the reaction center from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Proteins*, 1(4):312–325, 1986.

[40] T.O. Yeates, H. Komiya, A. Chirino, D.C. Rees, J.P. Allen, és G. Fehér. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1.: Protein-cofactor (bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and carotenoid) interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7993–7997, 1988.

[41] R.J. Debus, G. Fehér, és M.Y. Okamura. LM complex of the reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26: Characterization and reconstitution with the H subunit. *Biochemistry*, 24:2488–2500, 1985.

[42] G. Fehér. Primary events in photosynthesis: Problems, speculations, controversies, and future trends. 32 köt., 369-440 old. Israel Journal of Chemistry, 1992.

[43] P. Maróti és J. Tandori. Nagytávolságú elektrontranszfer fehérjékben. *Fizikai szemle*, 8:311–317, 1993.

[44] C.R.D. Lancaster, U. Ermler, és H. Michel. The structures of photosynthetic reaction centers from purple bacteria as revealed by X-ray crystallography. In R.E. Blankenship, M.T. Madigan, és C.E. Bauer (szerk.): *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (konferenciaanyag), 503-526 old. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1995.

[45] M.E. Michel-Beyere, M. Plato, J. Deisenhofer, H. Michel, M. Bixon, és J. Jortner. Unidirectionality of charge separation in reaction centers of photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 932:52–70, 1988.

[46] R.A. Marcus és N. Sutin. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 811:265–322, 1985.

[47] V. Nagarajan, W.W. Parson, D. Davis, és C.C. Schenck. Kinetics and free energy gaps of electrontransfer reactions in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochemistry*, 32:12324–12336, 1993.

[48] N.W. Woodbury, J.M. Peloquin, R.G. Alden, X. Lin, S. Lin, A.K.W. Taguchi, és J.C. Wiliams J.P. Allen. Relationship between thermodinamics and mechanism during photoinduced charge separation in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 33:8101–8112, 1994.

[49] T. Arlt, S. Schmidt, W. Kaiser, C. Lauterwasser, M. Meyer, H. Scheer, és W. Zinth. The accessory bacteriochlorophyll: A real electron carrier in primary photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:11757–11761, 1993.

[50] D. Kolbasov és A. Scherz. Asymmetric electron transfer in reaction centers of purple bacteria strongly depends on different electron matrix elements in the active and inactive branches. *J. Phys. Chem. B*, 104:1802–1809, 2000.

[51] C. Kirmaier és D. Holten. Primary photochemistry of reaction centers from the photosynthetic purple bacteria. *Photosynthesis Research*, 13(3):225–260, 1987.

[52] N.W. Woodbury és J.P. Allen. The pathway, kinetics and thermodynamics of electron transfer in the reaction centers of purple nonsulfur bacteria. In R.E. Blankenship, M.T. Madigan, és C.E. Bauer (szerk.): *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (konferenciaanyag), 527-557 old. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1995.

[53] V.P. Shinkarev és C.A. Wraight. Electron and proton transfer in the acceptor quinone complex of reaction centers of phototropic bacteria. I köt., 193-255 old. Academic Press, San Diego, 1993.

[54] D.M. Tiede, J. Vázquez, J. Córdova, és P.A. Marone. Time-resolved electrochromism associated with the formation of quinone anions in the *Rhodobacter spharoides* R-26 reaction center. *Biochemistry*, 35:10763–10775, 1996.

[55] R. Hienerwadel, S. Grzybek, C. Fogel, W. Kreutz, M.Y. Okamura, M.L. Paddock, J. Breton, E. Nabedryk, és W. Mäntele. Protonation of GluL212 following Q_B^- formation in the photosynthetic reaction of *Rhodobacter sphaeroides*: Evidence from time-resolved infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 34:2832–2843, 1995.

[56] J. Li, D. Gilroy, D.M. Tiede, és M.R. Gunner. Kinetic phases in the electron transfer from $P^+Q_A^-Q_B$ to $P^+Q_AQ_B^-$ and the associated processes in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers. *Biochemistry*, 37:2818–2829, 1998.

[57] L.M. Utschig, Y. Ohigashi, M.C. Thurnauer, és D.M. Tiede. A new metal-binding site in photosynthetic bacterial reaction centers that modulates Q_A to Q_B electron transfer. *Biochemistry*, 37:8278–8281, 1998.

[58] L.M. Utschig, O. Poluektov, S.L. Schlesselman, M.C. Thurnauer, és D.M. Tiede. Cu^{2+} site in photosynthetic bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, and *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochemistry*, 40:6132–6141, 2001.

[59] J. Li, E. Takahashi, és M.R. Gunner. -ΔG^0_{AB} and pH dependence of the electron transfer from $P^+Q_A^-Q_B$ to $P^+Q_AQ_B^-$ in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochemistry*, 39:7445–7454, 2000.

[60] D.M. Tiede, L.M. Utschig, D.K. Hanson, és D.M. Gallo. Resolution of electron and proton transfer events in the electrochromism associated with quinone reduction in bacterial reaction centers. *Photosynthetic Research*, 55:267–273, 1998.

[61] K. Warncke, M.R. Gunner, B.S. Braun, L. Gu, C.A. Yu, J.M. Bruce, és P.L. Dutton. Influence of hydrocarbon tail structure on quinone binding and electron-transfer performance at the Q_A and Q_B sites of the photosynthetic reaction center protein. *Biochemistry*, 33:7830–7841, 1994.

[62] N.W. Woodbury, W.W. Parson, M.R. Gunner, R.C. Prince, és P.L. Dutton. Radical-pair energetics and decay mechanisms in reaction centers containing anthraquinones, naphtoquinones or benzoquinones in place of ubiquinone. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 851:6–22, 1986.

[63] D. Kleinfeld, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Electron transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides.* Determination of the charge recombination pathway of $D^+Q_AQ_B^-$ and free energy and kinetic relations between $Q_A^-Q_B$ and $Q_AQ_B^-$. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 766:126–140, 1984.

[64] P. Maróti és C.A. Wraight. Flash-induced H^+ binding by bacterial photosynthetic reaction centers: Influences of the redox states of the acceptor quinones and primary donor. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 934(3):329–347, 1988.

[65] L.J. Mancino, D.P. Dean, és R.E. Blankenship. Kinetics and thermodynamics of the $P870^+Q_A^- \rightarrow P870^+Q_B^-$ reaction in isolated reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 764(1):46–54, 1984.

[66] M.Y. Okamura és G. Fehér. Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 61:861–896, 1992.

[67] P. Mitchell. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Phil Soc.*, 41:445–502, 1966.

[68] L. Kálmán és P. Maróti. Conformation-activated protonation in reaction centers of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 36:15269–15276, 1997.

[69] P. Maróti és C.A. Wraight. Flash-induced H^+ binding by bacterial photosynthetic reaction centers: comparison of spectrophotometric and conductometric methods. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 934(3):314–328, 1988.

[70] P.H. McPherson, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Light-induced proton uptake by photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. I. Protonation of the one electron states $D^+Q_A^-$, DQ_A^-, $D^+Q_AQ_B^-$ and $DQ_AQ_B^-$. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 934(3):348–368, 1988.

[71] P. Ädelroth, M.L. Paddock, L.B. Sagle, G. Fehér, és M.Y. Okamura. Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Both protons associated with reduction of Q_B to Q_BH_2 share a common entry point. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(24):13086–13091, 2000.

[72] M.S. Graige, M.L. Paddock, J.M. Bruce, G. Fehér, és M.Y. Okamura. Mechanism of proton-coupled electron transfer for quinone (Q_B) reduction in reaction centers of *Rb. sphaeroides*. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:9005–9016, 1996.

[73] M.S. Graige, M.L. Paddock, G. Fehér, és M.Y. Okamura. Observation of the protonated semiquinone intermediate in isolated reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: Implications for the mechanism of electron and proton transfer in proteins. *Biochemistry*, 38:11465–11473, 1999.

[74] M. Di Donato, R. Borrelli, A. Capobianco, G. Monaco, R. Improta, M. Brahimi, és A. Peluso. Proton assisted electron transfer. *Adv. Quantum. Chem.*, 36:301–322, 2000.

[75] A. Peluso, M. Di Donato, és G.A.A. Saracino. An alternative way of thinking about electron transfer in proteins: Proton assisted electron transfer between the primary and the secondary quinones in photosynthetic reaction centers. *J. Chem. Phys.*, 113:3212–3218, 2000.

[76] Sz. Osváth és P. Maróti. Coupling of cytochrome and quinone turnovers in the photocycle of reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophysical Journal*, 73:972–982, 1997.

[77] D. Kleinfeld, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Electron transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. II Free energy and kinetic relations between the acceptor states $Q_A^-Q_B^-$ and $Q_AQ_B^{2-}$. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 890:291–310, 1985.

[78] E. Takahashi és C.A. Wraight. Proton and electron transfer in the acceptor quinone complex of *Rhodobacter sphaeroides*: Characterization of site-directed mutants of

two ionizable residues, Glu^{L212} and Asp^{L213}, in the Q_B binding site. *Biochemistry*, 31:855–866, 1992.

[79] C.C. Schenck, R.E. Blankenship, és W.W. Parson. Radical-pair decay kinetics, triplet yields and delayed fluorescence from bacterial reaction centers. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 680(1):44–59, 1982.

[80] A. Ogrodnik, H.W. Kruger, H. Orthuber, R. Haberkorn, M.E. Michel-Beyerle, és H. Scheer. Recombination dynamics in bacterial photosynthetic reaction centers. *Biophysical Journal*, 39(1):91–99, 1982.

[81] C.A. Wraight és R.R. Stein. Bacterial reaction centers as a model for photosystem II. Turnover of the secondary acceptor quinone. In Y. Inoue, A.R. Crofts, N.M. Govindjee, G. Renger, és K. Satoh (szerk.): *The Oxigen Evolving System of Photosythesis* (konferenciaanyag), 383-392 old. Academic Press, Tokyo, 1983.

[82] Q. Xu és M.R. Gunner. Temperature dependence of the free energy, enthalpy, and entropy of $P^+Q_A^-$ charge recombination in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers. *J. Phys. Chem. B*, 104:8035–8043, 2000.

[83] W.W. Parson. The bacterial reaction center. In J. Amesz (szerk.): *Photosynthesis* (konferenciaanyag), 43-61 old. Elsevier, Amsterdam, 1987.

[84] A. Labahn, M. Paddock, L. McPherson, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Direct charge recombination from $D^+Q_AQ_B^-$ to DQ_AQ_B in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides. J. Phys. Chem. B*, 98:3417–3423, 1994.

[85] G.J. Edens, M.R. Gunner, Q. Xu, és D.C. Mauzerall. The enthalpy and entropy of reaction for formation $P^+Q_A^-$ from excited reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides. J. Am. Chem. Soc.*, 122:1479–1485, 2000.

[86] D.C. Mauzerall, M.R. Gunner, és J.W. Zhang. Volume contraction on photoexcitation of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: Internal probe of dielectrics. *Biophysical Journal*, 68:275–280, 1995.

[87] V. Brumfeld, L. Nagy, V. Kiss, és S. Malkin. Wide-frequency hydrophone detection of laser-induced photoacoustic signals in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, 70:607–615, 1999.

[88] S. Malkin és O. Canaani. The use and characteristics of the photoacoustic method in the study of photosyhthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45:493–526, 1994.

[89] S. Malkin, S. Churio, S. Shochat, és S. Braslavsky. Photochemical energy storage and volume changes in the microsecond time range in bacterial photosynthesis - A laser induced optoacoustic study. *J. Photochem. Photobiol. B:Biol.*, 23:79–85, 1994.

[90] L. Nagy, V. Kiss, V. Brumfeld, és S. Malkin. Thermal and structural changes of photosynthetic reaction centers characterized by photoacoustic detection with a broad frequency band hydrophone. *Photochem. Photobiol.*, 74(1):81–87, 2001.

[91] O. Punchenkov, Z. Kopf, és S. Malkin. Photoacoustic diagnostic of laser-induced processes in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1231:197–212, 1995.

[92] B.L. Strehler és W. Arnold. Light production by green plants. *The Journal of General Physiology*, 34(6):809–820, 1951.

[93] W. Arnold és J. Thompson. Delayed light production by blue-green algea, red algea and purple bacteria. *J. Gen. Physiol.*, 39:311–, 1955.

[94] J.C. Goedheer. Afterglow of chlorophyll *in vivo* and photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 64:294–, 1962.

[95] J.C. Goedheer. A cooperation of two pigment systems and respiration in photosynthetic luminescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 66:61–, 1963.

[96] R.K. Clayton és W.F. Bertsch. Absence of delayed light emission in the millisecond time range from mutant of *Rhodopseudomonas sphaeroides* which lacks functioning photosynthetic reaction centers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18:415–, 1965.

[97] R.K. Clayton. Characteristics of fluorescence and delayed light emission from green photosynthetic bacteria and algea. *J. Gen. Physiol.*, 48:633–, 1965.

[98] R.P. Carithers és W.W. Parson. Delayed fluorescence from *Rhodopseudomonas viridis* following single flashes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 387:194–211, 1975.

[99] D.E. Fleischman. Delayed fluorescence and the reversal of primary photochemistry in *Rhodopseudomonas viridis*. *Photochem. Photobiol.*, 19:59–, 1974.

[100] R.P. Carithers és W.W. Parson. Delayed fluorescence from *Rhodobacter sphaeroides* following single flashes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 440:215–232, 1976.

[101] G. Christen, R. Steffen, és G. Renger. Delayed fluorescence emitted from light harvesting complex II and photosystem II of higher plants in the 100 ns - 5 μs time domain. *FEBS Letters*, 475:103–106, 2000.

[102] K.L. Zankel, D.W. Reed, és R.K. Clayton. Fluorescence and photochemical quenching in photosynthetic reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61(4):1243–1249, 1968.

[103] N.W. Woodbury és W.W. Parson. Nanosecond fluorescence from isolated photosynthetic reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 767:345–361, 1984.

[104] K. Turzó, G. Laczkó, és P. Maróti. Proton binding is part of protein relaxation of flash-excited reaction center from photosythetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Israel Journal of Chemistry*, 39:447–455, 1999.

[105] J.P. Brandner, A.G. McEwan, S. Kaplan, és T. Donohue. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c_2 structural gene. *Journal of Bacteriology*, 171(1):360–368, 1989.

[106] T.A. Kunkel. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488–492, 1985.

[107] E. Takahashi, P. Maróti, és C.A. Wraight. Site-directed mutagenesis of *Rhodobacter sphaeroides* reaction center: the role of tyrosine L222. In M. Baltscheffsky (szerk.): *Current Research in Photosynthesis* (konferenciaanyag), I köt., 169-172 old. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, 1990.

[108] E. Takahashi, T.A. Wells, és C.A. Wraight. Protein control of the redox potential of the primary acceptor quinone in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 40:1020–1028, 2001.

[109] G. Cohen-Bazire, W.R. Sistrom, és R.Y. Stainer. Kinetic studies pigment synthesis by non-sulphur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 48:25–68, 1957.

[110] T.J. Donohue, A.G. McEwan, és S. Kaplan. Cloning, DNA sequence, and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c_2 gene. *Journal of Bacteriology*, 168(2):962–972, 1986.

[111] P.H. McPherson, M. Schönfeld, M.L. Paddock, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Protonation and free energy changes associated with formation of Q_BH_2 in nativ and Glu212$\longrightarrow$ Gln mutant reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 33:1181–1193, 1994.

[112] J.M. Ortega, P. Mathis, J.C. Williams, és J.P. Allen. Temperature dependence of the reorganization energy for charge recombination in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 35:3354–3361, 1996.

[113] R. Schmid és A. Labahn. Temperature and free energy dependence of the direct charge recombination rate from the secondary quinone in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem. B.*, 104:2928–2936, 2000.

[114] D.W. Marquardt. An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, 11(2):431–441, 1963.

[115] P.L. Dutton, K.M. Petty, H.S. Bonner, és S.D. Morse. Cytochrome c_2 and reaction center of *Rhodospeudomonas spheroides Ga.* membranes. Extinction coefficients, content, half-reduction potentials, kinetics and electric field alterations. *Biochim. Biophys. Acta*, 387:536–556, 1975.

[116] K. Turzó, G. Lackó, Z. Filus, és P. Maróti. Quinone-dependent delayed fluorescence from the reaction center of photosynthetic bacteria. *Biophysical Journal*, 79:14–25, 2000.

[117] K. Turzó, G. Laczkó, és P. Maróti. Delayed fluoreszcence study on $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ charge separation energetics linked to protons and salt in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis Research*, 55:235–240, 1998.

[118] P.H. McPherson, V. Nagarajan, W.W. Parson, M.Y. Okamura, és G. Fehér. pH-dependence of the free energy gap between DQ_A and $D^+Q_A^-$ determined from delayed fluorescence in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1019(1):91–94, 1990.

[119] S.J. Strickler és R.A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.*, 37:814–822, 1962.

[120] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Jr. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, és P.A Kollman. A second order generation force field for the simulations of proteins and nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:5179–5197, 1995.

[121] A.D. McKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott R.L. Dunbrack Jr., J.D. Evanseck, M.J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F.T.K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D.T. Nguyen, B. Prodhom, W.E. Reiher III, B. Roux, M. Schlenkrich, J.C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, és M. Karplus. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem.*, 102:3586–3616, 1998.

[122] W.F. van Gunsteren és H.J.C. Berendsen. *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*. Biomos B.V., Groningen, The Netherlands, 1987.

[123] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, és D.A. Case. An all atom forcefield for simulation of proteins and nucleic acids. *J. Comput. Chem.*, 7:230–252, 1986.

[124] L. Verlet. Computer experiments on classical fluids. II. Equilibrium correlation functions. *Physical Review*, 165(1):201–214, 1968.

[125] L. Verlet. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review*, 159(1):98–103, 1967.

[126] J. Åqvist, C. Medina, és J.E. Samuelsson. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Engineering*, 7(3):385–391, 1994.

[127] P. Kollman. Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. *Chemical Reviews*, 93:2395–2417, 1993.

[128] J.-R. Burie, C. Boullais, M. Nonella, C. Mioskowski, E. Naberdryk, és J. Breton. Importance of the conformation of methoxy groups on the vibrational and electrochemical properties of ubiquinones. *J. Phys. Chem. B*, 101:6607–6617, 1997.

[129] J.C. McComb, R.R. Stein, és C.A. Wraight. Investigations on the influence of headgroup substitution and isoprene side-chain length in the function of primary and secondary quinones of bacterial reaction centers. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1015(1):156–171, 1990.

[130] R.C. Prince, T.R. Halbert, és T.H. Upton. In C.H. Kim, H. Tedeschi, J.J. Diwan, és J.C. Salerno (szerk.): *Advances in Membrane Biochemistry and Bioenergetics* (konferenciaanyag), 469-478 old. Plenum Press, New York, 1988.

[131] H.H. Robinson és S.D. Kahn. Interplay of substituent conformation and electron affinity in quinone models of quinone reductases. *J. Am. Chem. Soc.*, 112(12):4728–4731, 1990.

[132] W.J. Coleman, D.C. Youvan, W. Aumier, U. Eberl, M. Volk, E. Lang, J. Siegl, R. Heckmann, W. Lersch, A. Ogrodnik, és M.E. Michel-Beyerle. In M. Baltscheffsky (szerk.): *Current Research in Photosynthesis* (konferenciaanyag), 153-156 old. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1990.

[133] H.U. Stilz, U. Finkele, W. Holzapfel, W. Lauterwasser, W. Zinth, és D. Oesterhelt. Influence of M subunit Thr222 and Trp252 on quinone binding and electron transfer in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centres. *Eur. J. Biochem.*, 223:233–242, 1994.

[134] M.R. Gunner, B.S. Braun, J.M. Bruce, és P.L. Dutton. In M.E. Michel-Beyerle (szerk.): *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria: Structure, Interactions and Dynamics* (konferenciaanyag), 298-304 old. Springer-Verlag, Berlin, 1985.

[135] M.R. Gunner, D.M. Tiede, R.C. Prince, és P.L. Dutton. In B.L. Trumpower (szerk.): *Function of Quinones in Energy Conserving Systems* (konferenciaanyag), 265-269 old. Academic Press, New York, 1982.

[136] K. Warncke és P.L. Dutton. Experimental resolution of the free energies of aqueous solvation contributions to ligand-protein binding: Quinone-Q_A site interactions in the photosynthetic reaction center protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(7):2920–2924, 1993.

[137] C.A. Wraight. Functional linkage between the Q_A and Q_B sites of photosynthetic reaction centers. In G. Garab (szerk.): *Photosynthesis: Mechanism and Effects* (konferenciaanyag), II köt., 693-698 old. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, 1998.

[138] T.A. Wells, E. Takahashi, és C.A. Wraight. Primary quinone (Q_A) binding site of bacterial photosynthetic centers: Mutations at residue M265 probed by FTIR spectroscopy. *Biochemistry*, 42:4064–4074, 2003.

[139] M.R. Gunner, D.E. Robertson, és P.L. Dutton. Kinetic studies on the reaction centers protein from *Rhodopseudomonas sphaeroides*: the temperature and free energy dependence of electron transfer between various quinones in the Q_A site and the oxidized bacteriochlorophyll dimer. *J. Phys. Chem. B*, 90:3783–3795, 1986.

[140] K.E. McAuley, P.K. Fyfe, J.P. Ridge, N.W. Isaaca, R.J. Cogdell, és M.R. Jones. Struktural details of an interaction between cardiolipin and integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:14706–14711, 1993.

[141] C.A. Wraight. Electron acceptors of bacterial photosythetic reaction centers: II. H^+ binding coupled to secondary electron transfer in the quinone acceptor complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 548:309–327, 1979.

[142] A.W. Schuettelkopf és D.M.F. van Aalten. PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica*, 60:1355–1363, 2004.

[143] J.P.P. Stewart. *MOPAC 93.00 Manual (Rev. 2).* Fujitsu Limited, Tokyom Japan, 1993.

[144] W.L. DeLano. *The PyMOL Molecular Graphics System.* DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002.

[145] Z. Zhu és M.R. Gunner. Energetics of quinone-dependent electron and proton transfer in *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, 44:82–96, 2005.

[146] C.A. Wraight. Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: Evidence for a new model of herbicide activity. *Israel Journal of Chemistry*, 21:348–354, 1981.

[147] J. Marelius, K. Kolmodin, I. Feierberg, és J. Åqvist. Q: A molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 16:213–225, 1998.

[148] B. Rabenteins, G.M. Ullmann, és E.W. Knapp. Energetics of electron-transfer and protonation reactions of the quinones in the photosynthetic reaction center of *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochemistry*, 37(8):2488–2495, 1998.

[149] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, és J. Hermans. Intermolecular forces. 331-342 old. Reidel, Dordrecht, 1981.

[150] A.W. Roszak, A.T. Gardiner, N.W. Isaacs, és R.J. Cogdell. Brominated lipids identify lipid binding sites on the surface of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 46:2909–2916, 2007.

[151] F.S. Lee és A. Warshel. A local reaction field method for fast evaluation of long-range electrostatic interactions in molecular simulation. *J. Chem. Phys.*, 97:3100–3107, 1992.

[152] J.P. Ryckaert, G. Ciccotti, és H.J.C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Physics*, 23:327–341, 1977.

[153] J. Åqvist. Calculation of absolute binding free energies for charged ligands and effects of long-range electrostatic interactions. *Journal of Computional Chemistry*, 17(14):1587–1597, 1996.

[154] G.M Moris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, és A.J. Olson. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *Journal of Computional Chemistry*, 19:1639–1662, 1998.

[155] G.M. Moris, D.S. Goodsell, R. Huey, és A.J. Olson. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 10:293–304, 1996.

[156] D.S. Goodsell és A.J. Olson. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 8:195–202, 1990.

[157] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.A. Case, U.C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, és S. Profeta P. Weiner. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:765–784, 1984.

[158] E.L. Mehler és T. Solmajer. Electrostatic effects in proteins: comparison of dielectric and charge models. *Protein Engineering*, 4:903–910, 1991.

[159] J. Breton, C. Boullais, J.R. Burie, E. Nabedryk, és C. Mioskowski. Bindig site of quinones in photosynthetic bacterial reaction centers invetigated by light-induced FTIR different spectroscopy: Assignment of the interactions of each carbonyl of Q_A in *Rhodobacter sphaeriodes* using site-specific ^{13}C-labeled ubiquinone. *Bichemistry*, 33:14378–14386, 1994.

[160] U. Ermler, G. Fritzsch, S. Buchanan, és H. Michel. In N. Murata (szerk.): *Research in Photosynthesis* (konferenciaanyag), I. köt., 341-347 old. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1992.

[161] G. King és A. Warshel. A surface constrained all-atom solvent model for effective simulations of polar solutions. *J. Chem. Phys.*, 91:3647–3661, 1989.

[162] U. Ermler, G. Fritzsch, S. Buchanan, és H. Michel. Structure if the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 $\mathring{A}$ resolution: Cofactors and protein-cofactor interactions. *Structure*, 2:925–936, 1994.

[163] A. Remy, R.B. Boers, T.E. Zachernyuk, P. Gast ans J. Lugtenburg, és K. Gerwert. Does different orientation of the methoxy groups of ubiquinone-10 in the reaction centre of *Rhodobacter sphaeroides* cause different binding at Q_A and Q_B? *Eur. J. Biochem.*, 270:3603–3609, 2003.

[164] A. Nonella. A quantum chemical investigation of structures, vibrational spectra and electron affinities of the radicals of quinone model compounds. *Photosynthesis Research*, 55:253–259, 2005.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Maróti Péter egyetemi tanárnak, a biológia tudományok doktorának, témavezetőmnek a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért, rendkívül értékes tanácsaiért és türelméért.

Köszönetemet fejezem ki Colin A. Wraight Professzornak, a University of Illinois, Biophysics and Plant Biology Center for Biophysics and Computational Biology tanszék vezetőjének azért, hogy laboratóriumában dolgozhattam, és rendelkezésemre bocsájtotta a mutáns reakciócentrumokat.

Szeretném megköszönni Dr. Nagy László egyetemi docensnek, mindazt amit közös munkáink során tőle megtanultam, és a sok tartalmas szakmai beszélgetést. Hálás vagyok Dr. Körtvélyesi Tamás egyetemi docensnek, hogy bevezetett a biológiai makromolekulákon végezhető modell-számítások rejtelmeibe és tanácsaival segítette előrehaladásomat. Köszönettel tartozom Dr. Laczkó Gábor egyetemi docensnek, aki segítségemre volt a munkámhoz szükséges különböző mérőberendezések megtervezésében és elkészítésében.

Hálás vagyok továbbá Dunai Péternének, aki körültekintően elrendezte az adminisztrációval kapcsolatos ügyeimet a szegedi évek alatt. Köszönöm Molnár Eszter és Laskayné Tóth Judit laboránsoknak, hogy laboránsi munkakörük lelkiismeretes és odaadó ellátásával gördülékennyé tették a munkát számomra. A volt Biofizikai Tanszék többi dolgozójának is köszönöm mindazt a segítséget amelyet munkám során számomra nyújtottak.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kiss Árpád Zoltán osztályvezetőnek, hogy látott bennem fantáziát és segítségével folytathattam kutatói pályámat a debreceni MTA Atommagkutató Intézetében. Dr. Sudárné Svingor Éva laboratórium-vezetőnek és Környezetanalitikai Laboratóriumban az összes munkatársamnak, pedig köszönöm a dolgozattal kapcsolatos segítségüket, valamint hogy nélkülözni tudták munkámat a disszertáció megírása alatt.

Köszönöm nővéremnek és férjének, hogy megadtak minden támogatást a tanulmányaim alatt. Feleségemnek tartozom még köszönettel, hogy mindvégig mellettem állt, és tanácsaival segítségemre volt a dolgozat elkészítésében.